

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**  
**Katedra za patološku morfologiju**

**Biljana V. Božić**  
**Doktor veterinarske medicine**

**UPOREDNA ANALIZA MORFOLOŠKIH  
PROMENA I DISTRIBUCIJE VIRUSNOG  
ANTIGENA U ORGANIMA LABUDOVA I  
KOKOŠAKA PRIRODNO INFICIRANIH  
VIRUSOM AVIJARNE INFLUENCE  
PODTIPA H5N8**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2019.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**  
**Department of pathology**

**Biljana V. Božić**  
**Doctor of veterinary medicine**

**COMPARATIVE ANALYSIS OF  
MORPHOLOGICAL LESIONS AND  
DISTRIBUTION OF VIRAL ANTIGEN IN  
MUTE SWANS AND HENS NATURALLY  
INFECTED WITH HIGHLY PATHOGENIC  
AVIAN INFLUENZA SUBTYPE H5N8**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2019.**

## **Mentori :**

**dr Sanja Aleksić Kovačević, redovni profesor**

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

**dr Vladimir Polaček, viši naučni saradnik**

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad"

## **Članovi komisije:**

**1. dr Ivana Vučićević, docent**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

**2. dr Miloš Vučićević, docent**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

**3. dr Tamaš Petrović, naučni savetnik**

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

## **Datum odbrane doktorske disertacije:**

.....

# **UPOREDNA ANALIZA MORFOLOŠKIH PROMENA I DISTRIBUCIJE VIRUSNOG ANTIGENA U ORGANIMA LABUDOVA I KOKOŠAKA PRIRODNO INFICIRANIH VIRUSOM AVIJARNE INFLUENCE PODTIPA H5N8**

## **REZIME**

Infekcije izazvane visoko patogenim virusima avijarne influence ustanovljene su kod ptica, velikog broja domaćih i divljih životinja i ljudi i iz tog razloga predstavljaju veliku opasnost sa aspekta veterinarske medicine i javnog zdravlja. Izrazita genetička varijabilnost i nestabilnost genoma influenza virusa omogućavaju nastanak velikog broja različitih podtipova virusa avijarne influence sa izmenjenim svojstvima u pogledu antigenskih osobina, patogenosti i specifičnosti prema domaćinu.

Novi, resortirani podtip visoko patogene avijarne influence H5N8 prvi put je dijagnostikovao na evropskom kontinentu 2014. godine. U Republici Srbiji, prva zabeležena epizootija avijarne influence podtipa H5N8 desila se krajem 2016. godine. Tokom ove epizootije, najveća stopa mortaliteta zabeležena je kod labudova grbca (*Cygnus olor*), a pored toga virus je dijagnostikovao i kod malog broja domaćih kokošaka gajenih u seoskim domaćinstvima. Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji imala su za cilj uporedno ispitivanje makroskopskih i mikroskopskih promena, distribucije i tropizma virusa, kao i određivanje imunofenotipa ćelija inflamacije u organima dve različite vrste ptica prirodno inficiranih virusom avijarne influence podtipa H5N8. U ispitivanjima su korišćeni organi 15 labudova grbaca (red Anseriformes) i 15 kokošaka (red Galliformes) uginulih tokom ove epizootije. Pored toga, cilj istraživanja bio je identifikacija i molekularna karakterizacija virusa avijarne influence detektovanog u Srbiji tokom zime 2016. – 2017. godine.

Za dokazivanje prisustva virusa influence u ispitanom materijalu poreklom od prirodno inficiranih ptica korišćena je real time RT-PCR metoda. Za utvrđivanje karaktera



lezija, distribucije virusnog antigena i imunofenotipa ćelija inflamacije u tkivu pluća, srca, slezine, creva, bubrega, pankreasa i mozga, primenjena su patohistološka i imunohistohemijska ispitivanja. Uzorkovana tkiva su makroskopski analizirana, fiksirana u formalinu i ukalupljena u parafinske blokove. Tkivni isecci su bojeni metodom hematoksilin-eozin i imunohistohemijskom metodom uz primenu komercijalnog kita "Novolink Polimer Detection System". Od primarnih antitela korišćena su antitela za nukleoprotein virusa avijarne influence, CD3, CD21 i GFAP. U proceni distribucije virusnog antigena u različitim tkivima korišćena je semikvantitativna analiza.

Primenom molekularno-genetičkih metoda (real-time RT-PCR) prisustvo virusa visoko patogene avijarne influence H5N8 potvrđeno je kod svih ispitanih uzoraka ptica. Filogenetskim analizama upotrebom softvera MEGA 6.0 utvrđeno je da virus pripada kladi 2.3.4.4. grupi B influenza virusa koji su cirkulisali na području evropskog kontinenta tokom 2016. i 2017. godine. Detektovani izolat virusa je srodan izolatima koji su utvrđeni u Mađarskoj, Hrvatskoj i Makedoniji.

Makroskopskim pregledom organa labudova najčešće promene u vidu krvavljenja, nekroze i kongestije bile su na srcu, pankreasu, slezini i plućima. Najučestalije patomorfološke promene uočene kod kokošaka bile su krvavljenja na plućima i srcu i pojava nekroza na slezini. Vrlo značajna razlika uočena je u učestalosti pojave nekroza i krvavljenja na pankreasu kod labudova i kokošaka. Ovaj nalaz je bio stalan kod inficiranih labudova, dok kod kokošaka makroskopskim pregledom nisu utvrđene promene na ovom organu. Pored toga, značajna razlika uočena je u makroskopskom nalazu na bubrezima, gde su kod kokošaka zapažena krvavljenja, dok su bubrezi labudova bili bez promena.

Mikroskopskim ispitivanjem organa obe vrste ptica, uočene su nekroze i krvavljenja različitog stepena zastupljenosti, nakupine limfocitnog infiltrata, kao i hiperemija krvnih sudova u većini organa. Mikroskopske lezije su po karakteru i zastupljenosti bile slične kod obe vrste ptica. Jedina vrlo značajna razlika ogledala se u učestalosti pojave krvavljenja u pankreasu kod labudova u odnosu na kokoške.

Primenom imunohistohemijske metode virusni antigen je detektovan u svim ispitanim organima, izuzev u crevima kod labudova. Ovaj nalaz može da ukazuje na to da je kod ove vrste ptica primarni put diseminacije virusa putem respiratornog sistema. Sa

druge strane, kod kokošaka je virusni antigen obilno eksprimiran u plućima i crevnom epitelu, ukazujući na to da se kod ove vrste ptica ekskrecija virusa odvija putem intestinalnog i respiratornog sistema. Razlike u zastupljenosti i ekspresiji virusnog antigena utvrđene su u srcu, plućima i crevima. U ovim organima, virusni antigen je značajno češće i u većoj količini detektovan kod kokošaka u odnosu na labudove. Najobimnija ekspresija virusnog antigena kod obe vrste ptica uočena je u mozgu i pankreasu. Imunohistohemijskom metodom je dokazano da virus avijarne influence H5N8 pokazuje tropizam prema ćelijama monocitno-makrofagnog sistema, epitelnim, endotelnim, nervnim ćelijama kao i prema epitelnim ćelijama bubrežnih tubula, enterocitima i bronhoalveolarnom epitelu. Pojava nervnih simptoma bolesti, velike količine virusnog antigena u mozgu, kao i velike količine GFAP<sup>+</sup> astrocita kod obe vrste ptica ukazuju na neurotropno svojstvo virusa.

U cilju determinacije fenotipskog profila ćelija zapaljenskog infiltrata u organima inficiranih ptica primenjen je metod imunohistohemije. Utvrđeno je da dominantnu ćelijsku populaciju u zapaljenskom infiltratu čine CD3<sup>+</sup> ćelije (T limfociti), dok su CD21<sup>+</sup> (B limfociti) zastupljeni u vrlo malom broju.

**Ključne reči:** avijarna influenza, H5N8, labudovi, kokoške, patomorfološke promene, distribucija antigena

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:** Patološka morfologija

**UDK broj:** 619:616.921.5

# **COMPARATIVE ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL LESIONS AND DISTRIBUTION OF VIRAL ANTIGEN IN MUTE SWANS AND HENS NATURALLY INFECTED WITH HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA SUBTYPE H5N8**

## **SUMMARY**

Highly pathogenic avian influenza viruses cause infections in birds, a large number of domestic and wild animals as well as in humans, and are the cause of serious veterinary and public health concern. The distinct genetic variability and instability of the influenza virus genome enable the creation of a large number of different subtypes of avian influenza virus with altered characteristics in terms of antigenic properties, pathogenicity and host specificity.

In 2014, a novel reassortant subtype of highly pathogenic avian influenza H5N8 was detected for the first time on the European continent. In the Republic of Serbia, the first outbreak of avian influenza subtype H5N8 was recorded at the end of 2016. The highest mortality rate during this outbreak was detected in the mute swans (*Cygnus Olor*) and the virus was also diagnosed in a small number of domestic hens in rural households. The aim of this PhD thesis was a comparative analysis of macroscopic and microscopic lesions, distribution and virus tropism as well as the determination of the inflammatory cell immunophenotyping in the organs of two different bird species naturally infected with the avian influenza virus subtype H5N8. The carcasses of 15 mute swans and 15 hens that died during the avian influenza outbreak were examined. In addition, the aim of this research was the identification and molecular characterization of the avian influenza virus detected in Serbia during the winter 2016-2017. The real-time RT-PCR method was performed for detection of H5N8 HPAI virus presence in materials originating from naturally infected birds. Pathohistological and immunohistochemical methods were used to determine the

character of lesions, the distribution of viral antigen and immunophenotyping of inflammatory cells in the lung, heart, spleen, intestine, kidney, pancreas and brain tissue. Selected tissue samples were macroscopically analyzed, fixed in formalin and embedded into paraffin blocks. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin and an immunohistochemically using the Novolink Polymer Detection System commercial kit. Antibodies for avian influenza nucleoprotein, CD3, CD21 and GFAP were used as primary antibodies. A semi-quantitative analysis was used for estimating the distribution of viral antigen in different tissues.

The presence of the highly pathogenic avian influenza virus H5N8 was confirmed in all tested bird samples using the molecular-genetic method (real-time RT-PCR). Phylogenetic analysis performed using MEGA 6.0 software found that the virus belongs to the cluster 2.3.4.4. group B influenza viruses that circulated in the area of the European continent during 2016 and 2017. The detected virus isolate is related to isolates found in Hungary, Croatia and Macedonia.

Macroscopic examination of organ samples from mute swans revealed the most frequent changes were haemorrhages, necrosis and congestion in heart, pancreas, spleen and lungs. The most frequent pathomorphologic changes observed in hens were haemorrhages of the lungs and heart as well as the presence of necrosis of the spleen. A very significant difference was observed in the incidence of necrosis and haemorrhages of the pancreas in hens and swans. This finding was constant in all infected swans, while in hens were no macroscopic lesions in this organ. In addition, a significant difference was observed in the macroscopic finding of the kidneys, where haemorrhages were observed in the hens, while there were no macroscopic lesions in the kidneys of mute swans.

Microscopic examination of the organs of both bird species revealed necrosis and haemorrhages of varying intensity, lymphocyte infiltrate accumulation, and hyperemia of the blood vessels in most organs. Character and severity of microscopic lesions were similar in both bird species. The only significant difference was the presence of haemorrhages in the pancreas of mute swans, while this finding wasn't observed in the pancreas of the hens.

The viral antigen was detected in all examined organs using the immunohistochemical method, except in the intestines of mute swans. This finding may indicate that in this bird species the primary route of virus dissemination is through the respiratory tract. On the other hand, the viral antigen is abundantly expressed in the lungs and intestinal epithelium of the hens, indicating that excretion of the virus occurs through the intestinal and respiratory system in this bird species. Differences in expression of viral antigen are found in the heart, lungs and intestines. In these organs, the viral antigen is significantly more frequent and more detectable in chickens than in the swans. The most abundant expression of viral antigen in both bird species was observed in the brain and pancreas. The immunohistochemical method has demonstrated that avian influenza virus H5N8 had a tropism to the monocyte-macrophage cells, epithelial, endothelial, nerve cells, including epithelial cells of the renal tubules, enterocytes and bronchoalveolar epithelium. The appearance of nervous symptoms of the disease, large amounts of viral antigen in the brain, and large amounts of GFAP + astrocyte in both bird species indicate the neurotrophic characteristic of the virus.

In order to determine the phenotypic profile of inflammatory cell infiltrate in organs of infected birds, immunohistochemistry was applied. The dominant cell population in the inflammatory infiltrate was CD3<sup>+</sup> cells (T lymphocytes), while CD21<sup>+</sup> (B lymphocytes) were present in a very small number.

**Keywords:** avian influenza, H5N8, mute swans, hens, pathomorphological lesions, antigen distribution

**Scientific area:** Veterinary Medicine

**Scientific field:** Pathological Morphology

**UDK:** 619:616.921.5

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Istorijat.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Etiologija.....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Taksonomija.....	8
2.2.2. Morfologija virusa influence.....	10
2.2.3. Otpornost virusa na fizičke i hemijske agense.....	14
<b>2.3. Replikacija virusa influence.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Patogeneza.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5. Klinička slika.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6. Patomorfološke promene.....</b>	<b>22</b>
2.6.1. Makroskopske promene.....	22
2.6.2. Patohistološke promene.....	23
<b>2.7. Imuni odgovor.....</b>	<b>26</b>
<b>2.8. Dijagnostika bolesti.....</b>	<b>29</b>
<b>2.9. Kontrola bolesti.....</b>	<b>33</b>
<b>2.10. Avijarna influenza kod domaće živine.....</b>	<b>35</b>
<b>2.11. Avijarna influenza kod divljih ptica.....</b>	<b>36</b>
2.11.1. Avijarna influenza kod labudova.....	39
<b>2.12. Epizootologija virusa avijarne influence podtipa H5N8 u svetu.....</b>	<b>40</b>
2.12.1. Karakteristike epizootije avijarne influence podtipa H5N8 u Srbiji..	44
<b>3. CILJ I ZADACI.....</b>	<b>46</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Materijal.....</b>	<b>47</b>
4.1.1. Ispitivani material.....	47
<b>4.2. Metode.....</b>	<b>48</b>
4.2.1 Molekularne metode detekcije i karakterizacije virusa avijarne influence.....	48

4.2.2.	Metoda reverzne transkripcije - lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real time RT-PCR).....	48
4.2.3.	Metoda sekvenciranja izolata virusa avijarne influence.....	54
4.2.4.	Izrada filogenetskog stabla.....	54
4.2.5.	Priprema patohistoloških preparata.....	56
4.2.6.	Hematoksilin eozin bojenje.....	57
4.2.7.	Imunohistohemijska metoda.....	57
4.2.8.	Semikvantitativna analiza.....	59
4.2.9.	Metode statističke obrade podataka.....	59
<b>5.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>60</b>
5.1.	Rezultati utvrđivanja genoma virusa avijarne influence primenom rt RT-PCR metode.....	60
5.2.	Rezultati filogenetske analize.....	62
5.3.	Rezultati patomorfološkog ispitivanja kod labudova.....	64
5.3.1.	Makroskopski nalaz na organima labudova.....	64
5.3.2.	Patohistološki nalaz na organima labudova.....	70
5.4.	Imunohistohemijski nalaz.....	75
5.4.1.	Ekspresija antigena virusa avijarne influence u tkivima labudova...	75
5.4.2.	Ekspresija CD3 antitela.....	79
5.4.3.	Ekspresija CD21 antitela.....	80
5.4.4.	Ekspresija GFAP.....	81
5.5.	Rezultati patomorfološkog ispitivanja kod kokošaka.....	82
5.5.1.	Makroskopski nalaz na organima kokošaka.....	82
5.5.2.	Patohistološki nalaz na organima kokošaka.....	87
5.6.	Imunohistohemijski nalaz.....	91
5.6.1.	Ekspresija antigena virusa avijarne influence u tkivima kokošaka...	91
5.6.2.	Ekspresija CD3 antitela.....	95
5.6.3.	Ekspresija CD21 antitela.....	96
5.6.4.	Ekspresija GFAP.....	97
5.7.	Razlike u zastupljenosti makroskopskih promena u organima labudova i kokošaka.....	98

5.8.	Razlike u zastupljenosti patohistoloških promena u organima labudova i kokošaka.....	99
5.9.	Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije virusnog antigena u organima labudova i kokošaka.....	100
6.	<b>DISKUSIJA.....</b>	102
7.	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	115
8.	<b>SPISAK LITERATURE.....</b>	117



## **SPISAK SKRAĆENIH NAZIVA KORIŠĆENIH U TEKSTU:**

<b>AI</b>	Avijarna influenza
<b>AIV</b>	Virus avijarne influence
<b>CNS</b>	Centralni nervni sistem
<b>EFSA</b>	Evropska agencija za bezbednost hrane
<b>GFAP</b>	Glijalni kiseli protein
<b>HA</b>	Hemaglutinin
<b>HE</b>	Hematoksilin eosin
<b>HPAI</b>	Visoko patogena avijarna influenza
<b>LPAI</b>	Nisko patogena avijarna influenza
<b>NA</b>	Neuraminidaza
<b>OIE</b>	Svetska organizacija za zdravlje životinja
<b>PALS</b>	Periarterijalni limfocitni sloj
<b>RNP</b>	Ribonukleoproteinski kompleks
<b>RT-PCR</b>	Reverzna transkripcija-lančana reakcija polimeraze
<b>real-time RT-PCR</b>	Polimerazna lančana reakcija u stvarnom vremenu
<b>SPF</b>	Slobodan od specifičnih patogena

## 1. UVOD

Avijarna influenza je sistemsko, kontagiozno oboljenje virusne etiologije. Uzročnici avijarne influence su jednolančani segmentirani RNK virusi, negativnog polariteta i pripadaju porodici *Orthomyxoviridae*. U okviru porodice *Orthomyxoviridae* nalaze se rodovi: *Influenza A, B, C, D, Isavirus, Thogotovirus* i *Quarantavirus*. Podjela je izvršena na osnovu antigenskih razlika u građi nukleoproteina i matriks proteina. Avijarna influenza virusi pripadaju rodu *Influenza A* i pored ptica mogu inficirati veliki broj toplokrvnih životinjskih vrsta, kao i ljude. Dalja podjela influenza A virusa izvršena je na osnovu postojanja površinskih glikoproteina hemaglutinina (HA) i neuraminidaze (NA). Do danas, izolovano je ukupno 16 HA subtipova i 9 NA subtipova influenza virusa kod divljih akvatičnih ptica. Influenza A viruse karakteriše izrazita genetička varijabilnost koja nastaje kao posledica procesa mutacije gena i genskih resortiranja. Time se objašnjava brza evolucija i postojanje velikog broja antigenski različitih podtipova virusa influence.

Na osnovu mogućnosti da dovedu do bolesti ili uginuća kod pilića (*Gallus domesticus*), influenza A virusi su dalje podeljeni na dve grupe: visoko patogeni virusi (eng. Highly Pathogenic Avian Influenza - HPAI) i nisko patogeni virusi (eng. Low Pathogenic Avian Influenza - LPAI). Visoko patogenim sojevima virusa avijarne influence smatraju se oni koji dovode do mortaliteta od 75 % kod 4 do 8 nedelja starih intravenozno inficiranih prijemljivih pilića ili oni kod kojih intravenozni indeks patogenosti iznosi 1.2 ili više. Nisko patogeni sojevi avijarne influence se održavaju u populaciji divljih akvatičnih vrsta ptica koje pripadaju redovima Anseriformes i Charadriiformes. Kod galiformnih vrsta, nisko patogeni sojevi avijarne influence obično ne dovode do oboljenja, ali se može ispoljiti blaga klinička slika koja podrazumeva smanjenu aktivnost, pad nosivosti ili pojavu blagih respiratornih smetnji. Kod divljih ptica, infekcije nisko patogenim sojevima virusa avijarne influence su obično subkliničke, ali je dokazano da mogu negativno da utiču na telesnu masu, migratorne i hranidbene performanse. Klinička slika i patomorfološki nalaz variraju kod različitih vrsta ptica u zavisnosti od soja i patogenosti virusa influence. Infekcija visoko

patogenim sojevima avijarne influence zahvata više visceralnih organa, kardiovaskularni i nervni sistem. Visoko patogeni sojevi virusa avijarne influence mogu biti epiteliotropni, endoteliotropni, neurotropni ili pantropni, u zavisnosti od vrste ptica domaćina. Kod kokošaka, glavne makroskopske promene izazvane visoko patogenim sojevima virusa avijarne influence su hemoragično-nekrotičnog karaktera, smeštene na serozama i sluznicama različitih organskih sistema. Mikroskopske promene u vidu multifokalnih nekroza i inflamacije najviše su zastupljene u mozgu, srcu, pankreasu, plućima i slezini. Čelije inflamacije, uglavnom makrofagi i heterofilni granulociti, igraju bitnu ulogu u inicijalnoj replikaciji i diseminaciji virusa avijarne influence, kao i replikaciji virusa unutar endotelnih ćelija. Visoko patogeni sojevi avijarne influence dovode do povećane vaskularne permeabilnosti i oštećenja vaskularnih endotelnih ćelija što rezultira pojavom edema, hemoragija i formiranjem mikrotromba.

Domaća živina iz reda Galliformes ne predstavlja prirodni rezervoar influenza A virusa, ali je podložna infekciji sojevima virusa influence koji vode poreklo od divljih ptica. Kod ovih vrsta ptica, HPAI virusi dovode do visoke stope uginuća. Sve do 2002. godine, infekcije HPAI virusima dovodile su do uginuća prvenstveno kod galiformnih vrsta, dok je kod divljih ptica zabeleženo svega nekoliko sporadičnih slučajeva mortaliteta. Međutim, sa pojavom izrazito patogenog azijskog virusa AI H5N1 beleži se značajna stopa mortaliteta kod velikog broja različitih vrsta divljih ptica širom sveta. Cirkulisanjem HPAI H5N1 virusa u populaciji domaće živine i divljih ptica tokom dužeg vremenskog perioda, virus je evoluirao u nekoliko genetski različitih klada i subklada. Novi, resortirani virus avijarne influence podtipa H5N8 koji pripada kladi 2.3.4.4 prvi put je detektovan u Kini 2010. godine da bi se od 2014. do danas proširio na evropski, azijski, afrički i severnoamerički kontinent. Globalnom širenju virusa doprinele su intra i interkontinentalne migracije ptica. Tokom 2016. godine u velikom broju evropskih zemalja potvrđeno je prisustvo virusa AI H5N8, kako kod domaće živine, tako i u populaciji divljih ptica, pre svega kod ptica iz reda *Anseriformes*.

Prvi slučaj avijarne influence podtipa H5N8 u našoj zemlji zabeležen je kod labudova grbaca (*Cygnus olor*) sa lokaliteta specijalnog rezervata prirode „Koviljsko-Petrovaradinski rit“, krajem 2016. godine. Tokom ove epizootije, labudovi su se pokazali

kao veoma osetljiva vrsta divljih ptica, sa visokim stepenom mortaliteta i pojavom nervnih simptoma bolesti. Pored labudova, virus je dijagnostikovao i kod kokošaka na dva različita lokaliteta, u Srednjobanatskom i Južnobačkom okrugu. Kao prvi slučaj avijarne influence u Srbiji od epizootije virusa avijarne influence podtipa H5N1 iz 2006. godine, prirodna infekcija sa virusom podtipa H5N8, predstavlja interesantan predmet morfoloških ispitivanja.

U veterinarskoj medicini, avijarni influenza virusi su predmet intenzivnog izučavanja više od pola veka. Mnoga pitanja vezana za patogenezu i osetljivost određenih vrsta ptica prema virusima avijarne influence i dalje su u određenoj meri nejasni i neispitani. U našoj zemlji do sada nisu publikovani naučni radovi o patomorfološkim promenama kod ptica prirodno inficiranih virusom avijarne influence podtipa H5N8. To je razlog zbog čega smo se opredelili da naše istraživanje izvršimo u uslovima prirodne infekcije i to kod labudova, vrste koja potencijalno predstavlja jedan od rezervoara i vektora bolesti, i kod kokošaka, kao predstavnika galiformnih vrsta ptica.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Istorijat

Prvi zapis o avijarnoj influenci datira još iz 1878. godine, kada je italijanski istraživač Perroncito opisao kontagioznu bolest koja izaziva visok mortalitet živine. Bolest koja je definisana kao „kuga živine” u početku je dovođena u vezu sa akutnom, septikemičnom formom kolere živine. Nedugo posle otkrića i opisa bolesti, 1880. godine Rivolta i Delprato na osnovu kliničkih i patoloških karakteristika dokazuju da je pitanju bolest drugačija od kolere živine i definišu je kao *Typhus exudatious gallinarum*. Centanni i Savunzzi 1901. godine dokazuju da je uzročnik kuge živine filtrabilan virus, dok je Burnet 1934. godine dokazao da se embrionirana pileća jaja mogu koristiti za umnožavanje virusa avijarne influence (Lupiani i Reddy, 2009). Otkrićem hemaglutinina influenza virusa, Lush je dokazao da su visoko patogeni virusi avijarne influence i virus Njukastl bolesti sposobni da aglutiniraju crvene krvne ćelije. Ovim otkrićem je takođe dokazano da između ova dva avijarna virusa ne postoji serološka povezanost. Virus je identifikovan i klasifikovan kao influenza A virus 1955. godine i dokazano je da je srodan sa drugim influenza virusima koji inficiraju ljude, svinje i konje (Swayne i Suarez, 2000). Naziv kuga živine zamenjena je adekvatnijim terminom – visoko patogena avijarna influenza (*eng.* Highly Pathogenic Avian Influenza – HPAI) na prvom internacionalnom simpozijumu za avijarnu influencu 1981. godine, u Merilendu, SAD.

Do sredine 20. veka, visoko patogena avijarna influenza bila je endemska bolest u centralnoj Evropi i Italiji. Usled nepostojanja odgovarajućih dijagnostičkih testova u to vreme i istovremene pojave virusa Njukastl bolesti, veoma je teško odrediti koji od ova dva virusa su dovođila do značajnih epizootija kod živine tokom prvih godina 20. veka. Do sredine 20. veka, visoko patogena avijarna influenza je prijavljena u većini evropskih

zemalja, Rusiji, severnoj Americi, južnoj Americi, bliskom istoku, Africi i Aziji (Lupiani i Reddy, 2009).

Usled postojanja indicija da životinjski influenza virusi predstavljaju potencijalni izvor oboljenja kod ljudi, Svetska zdravstvena organizacija (WHO) je od 1958. godine sprovodila istraživanja o ekologiji influenza virusa kod divljih životinja. Deset godina kasnije, rađena su serološka ispitivanja kod divljih ptica u SAD, Australiji i Rusiji kako bi se dokazalo prisustvo virusa avijarne influence u populaciji ovih ptica. Do 1973. godine, influenza A virusi su dokazani samo u dva slučaja kod divljih ptica: morske čigre (A/tern/South Africa/61 (H5N9)) i morske burnice (A/shearwater/East Australia/72 (H6N5)). Do danas, virusi avijarne influence su izolovani u preko 105 različitih vrsta divljih ptica, iz 26 različitih familija (Olsen i sar., 2006). Najznačajniji događaji u istoriji avijarne influence do 1981. godine prikazani su u tabeli 1.

**Tabela 1.** Najznačajniji događaji u istoriji avijarne influence do 1981. godine (prilagođeno prema Alexander, 2003).

<b>Godina</b>	<b>Događaj</b>
<b>1878.</b>	<i>Prvi zapis o bolesti „kuga živine”</i>
<b>1901.</b>	<i>Dokazivanje da je uzročnik kuge živine filtrabilan virus</i>
<b>1901-1930</b>	<i>Epizootije avijarne influence širom sveta</i>
<b>1918.</b>	<i>Pandemija influence u humanoj populaciji</i>
<b>1931.</b>	<i>Prva izolacija virusa influence kod svinja</i>
<b>1934.</b>	<i>Umnožavanje virusa influence u embrioniranim jajima</i>
<b>1941.</b>	<i>Dokazivanje efekta hemaglutinacije eritrocita virusom influence</i>
<b>1955.</b>	<i>Dokazivanje da je uzročnik „kuge živine” influenza virus</i>
<b>1959.</b>	<i>Prva izolacija virusa influence kod pilića</i>
<b>1961.</b>	<i>Prva izolacija virusa influence kod divlje ptice</i>
<b>1970.</b>	<i>Intenzivna istraživanja virusa avijarne influence kod ptica</i>
<b>1981.</b>	<i>Prvi internacionalni simpozijum o avijarnoj influenci</i>

Nova era u istoriji avijarne influence počinje sredinom 20. veka kada su prvi put izolovane manje virulentne forme virusa. U pitanju su bili virusi izolovani kod domaćih pataka sa respiratornim smetnjama: u Kanadi (A/Duck/Canada/52 (H10N7)), Čehoslovačkoj (A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6)), Engleskoj (A/duck/England/56 (H11N6)) i Ukrajini (A/duck/Ukraine/60 (H11N8)). Sve do sredine pedesetih godina prošlog veka svi izolovani HPAI virusi pripadali su H7 subtipu. Međutim, 1959. i 1961. godine u Škotskoj (A/chicken/Scotland/59 (H5N1)) i Južnoj Africi (A/tern/South Africa/61 (H5N3)) izolovana su dva nova HPAI virusa koja su pripadala subtipu H5 i koja su uzrokovala istu kliničku sliku kao klasična kuga živine. Ovim otkrićem je donešen pogrešan zaključak da su subtipovi avijarne influence H5 i H7 uvek visoko patogeni. Međutim, ova tvrdnja se kasnije pokazala kao netačna kada su izolovani nisko patogeni subtipovi virusa influence podtipa H5 i H7 u Kanadi (A/turkey/Ontario/66 (H5N9)), Viskonsinu (A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9)) i Oregonu (A/turkey/Oregon/71 (H7N3)). Naknadno, tokom šezdesetih godina prošlog veka, nekoliko nisko patogenih subtipova avijarne influence izolovano je kod ćurki, pataka, prepelica, fazana i jarebica koji su pokazivali respiratorne i reproduktivne znake bolesti, ukazujući na veliko variranje među influenza virusima.

Iako prvi zapis o avijarnoj influenci datira iz 1878. godine, prvi potvrđen slučaj visoko patogene avijarne influence zabeležen je u Škotskoj 1959. godine. Nakon toga, velike enzootije zabeležene su u SAD 1983. godine (H5N2), Meksiku 1994. godine (H5N2), Pakistanu 1994. godine (H7N3), Honk-Kongu 1997. godine (H5N1), 1999. godine u Italiji (H7N1) i 2002. godine u Čileu (H7N3). Najveća zabeležena epizootija avijarne influence izazvana podtipom H5N1 2003. godine imala je globalnu distribuciju i nanela je velike ekonomske gubitke živinarskoj proizvodnji. Od 2003. godine smatra se endemskom na području azijskog kontinenta. Globalnom širenju i prenošenju HPAI H5N1 virusa na populaciju domaće živine svakako su doprinele i klimatske promene koje su posledično uticale na varijacije u migratornim rutama divljih ptica (Capua i Alexander, 2004). Pored značajnih posledica po živinarsku proizvodnju ovaj podtip virusa avijarne influence imao je značajnih posledica i na zdravlje ljudi. Prvi smrtni slučaj kod ljudi inficiranih ovim podtipom virusa influence zabeležen je 1997. godine. Tokom 20. veka, tri najveće

zabeležene influenza pandemije desile su se 1918. godine (H1N1 – „Španski grip”), 1957. godine (H2N2 – „Azijski grip”) i 1968. godine (H3N2 – „Hong-Kongški grip“), koje su rezultirale stopom mortaliteta kod ljudi od preko 50 miliona (Vandegrift i sar., 2010). Pored H5N1 podtipa virusa avijarne influence, kod ljudi su zabeležene infekcije i drugim podtipovima virusa AI, poput H7N3, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H6N1 i H10N8 (Morens et al., 2013; WHO, 2014).

Istorijski gledano, najznačajnije epizootije avijarne influence do 2007. godine prikazane su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Najznačajnije prijavljene epizootije avijarne influence u svetu od 1959. godine do 2007.godine (prilagođeno prema Alexander, 2007).

<b>Virus</b>	<b>Podtip</b>	<b>Vrste inficiranih ptica</b>
A/chicken/Scotland/59	H5N1	Pilići
A/tern/South Africa/61	H5N3	Morska čigra
A/turkey/England/63	H7N3	Ćurke
A/turkey/Ontario/7732/66	H5N9	Ćurke
A/chicken/Victoria/76	H7N7	Pilići, patke
A/chicken/Germany/79	H7N7	Pilići, guske
A/turkey/England/199/79	H7N7	Ćurke
A/chicken/Pennsylvania/1370/83	H5N2	Pilići, ćurke
<b>A/turkey/Ireland/1378/83</b>	<b>H5N8</b>	<b>Ćurke</b>
A/chicken/Victoria/85	H7N7	Pilići
A/turkey/England/50-92/91	H5N1	Ćurke
A/chicken/Victoria/1/92	H7N3	Pilići
A/chicken/Queenland/667-6/94	H7N3	Pilići
A/chicken/Mexico/8623-607/94	H5N2	Pilići
A/chicken/Pakistan/447/94	H7N3	Pilići
A/chicken/NSW/97	H7N4	Pilići
A/chicken/Hong Kong/97	H5N1	Pilići, patke
A/chicken/Italy330/97	H5N2	Pilići
A/turkey/Italy/99	H7N1	Ćurke
A/chicken/Chile/02	H7N3	Pilići
A/greyheron/HongKong/861.1/02	H5N1	Divlje ptice
A/chicken/Netherlands/03	H7N7	Pilići
A/chicken/Asia, Europe and Africa/03-07	H5N1	Pilići, patke
A/chicken/Texas/04	H5N2	Pilići
A/chicken/Canada/04	H7N3	Pilići
A/ostrich/South Africa/04	H5N2	Nojevi
A/chicken/North Korea/05	H7N7	Pilići
A/turkey/England/07	H5N1	Ćurke



Iz tabele se može videti da je prvi slučaj infekcije AIV H5N8 zabeležen 1983. godine u Irskoj, kod ćuraka. Nakon ove epizootije, duži vremenski period nisu zabeleženi slučajevi infekcije ovim podtipom virusa AI sve do 2001. godine, kada je detektovan novi slučaj prilikom monitoringa divljih ptica u Nju Džersiju, SAD (Dalby i Iqbal, 2015). Novi, resortirani podtip avijarne influence H5N8 detektovan je 2010. godine u Kini. Dokazano je da je ovaj, novi podtip virusa AI H5N8 nastao kao produkt kontinuiranih genskih resortiranja i evolucije (Kim i sar., 2015).

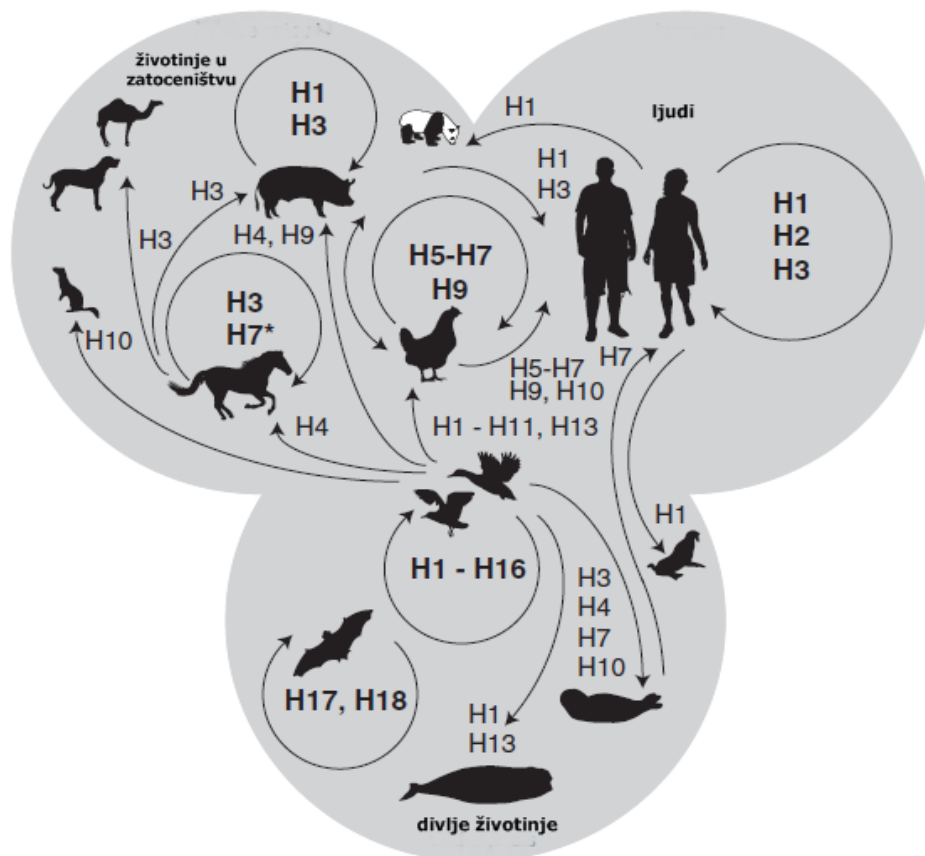
Pojava visoko patogene avijarne influence u našoj zemlji zabeležena je u dva navrata – tokom 2006. godine kada je dijagnostikovao podtip AI H5N1 i tokom zime 2016. - 2017. godine kada je detektovan podtip AI H5N8. Obe epizootije su prijavljene svetskoj organizaciji za zdravlje životinja (OIE) i nisu zabeleženi značajni ekonomski gubici u živinarskoj proizvodnji.

## **2.2. Etiologija**

### **2.2.1. Taksonomija**

Uzročnik avijarne influence je virus koji pripada familiji *Orthomyxoviridae* (grčki *orthos* – pravi, *myxa* – mukus) i rodu *Influenzavirus*. U okviru familije *Orthomyxoviridae* nalaze se rodovi: *influenza A*, *B*, *C*, *D*, *Isavirus*, *Thogotovirus* i *Quaranjavirus*. Različiti rodovi influenza virusa se razlikuju u patogenosti i krajnjem domaćinu i pretpostavlja se da su se evolutivno odvojili pre nekoliko hiljada godina. Influenca A i B virusi imaju sličnu strukturu, dok se influenza C virusi znatno razlikuju (Taubenberger i Kash, 2010). Influenca virusi iz roda B i C uglavnom dovode do infekcija kod ljudi, mada su influenza B virusi izolovani kod foka, a influenza C virusi kod svinja i pasa. Sa druge strane, virusi iz roda A mogu da uzrokuju infekcije velikog broja toplokrvnih životinjskih vrsta, uključujući ptice, svinje, konje, pse, mačke, divlje životinje, kao i infekcije ljudi. Međutim, divlje

migratorne vodene ptice se smatraju izvornim rezervoarom većine influenza A virusa u prirodi (slika 1). Jedino virusi iz roda Influenza A poseduju značajan zoonotski i pandemijski potencijal (Taubenberger i Kash, 2010). Influenza A virusi su klasifikovani na podtipove na osnovu antigenski različitih membranskih proteina, hemaglutinina (HA) i neuraminidaze (NA). Ovi proteini su veoma bitni za indukovanje imunog odgovora domaćina i visoko su varijabilni. Influenza A virusi se obeležavaju oznakama u kojima je naveden tip HA i NA (npr. podtip H5N1). Kod divljih ptica, do danas je izolovano ukupno 16 tipova HA (H1-H16) i 9 tipova NA (N1-N9), u brojnim različitim kombinacijama. Nedavno su kod slepih miševa izolovani i novi podtipovi influenza A virusa - H17N10 i H18N11 (Tong i sar., 2013).



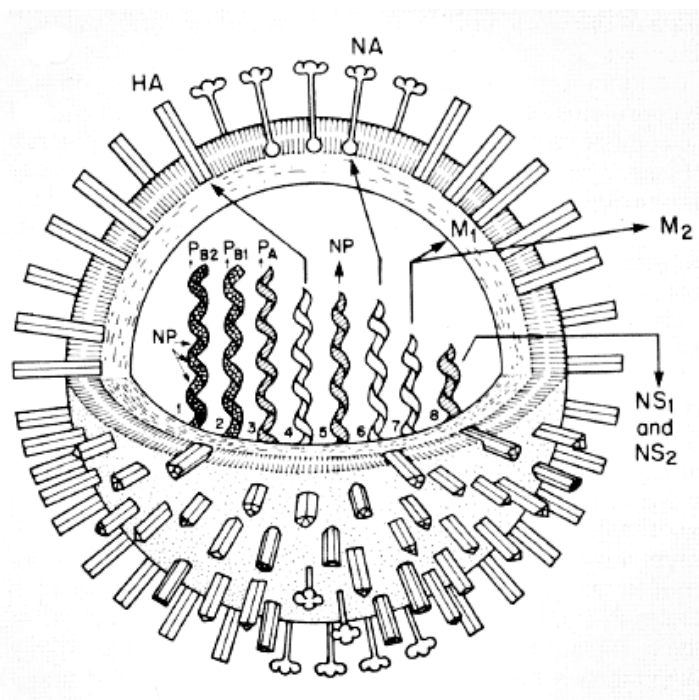
**Slika 1.** Rezervoari virusa i inter-specijes prenošenje influenza A virusa u prirodi. Pojedini podtipovi AIV se održavaju u populaciji divljih ptica, domaće živine, slepih miševa, svinja, konja i ljudi (označeni okruglastim strelicama) (prilagođeno prema Short i sar., 2015).

Veoma važna karakteristika influenza A virusa je velika stopa mutacija koje se neprekidno dešavaju pri čemu nastaju novi mutirajući sojevi virusa. Akumulacije mutacija se javljaju kao posledica selektivnog pritiska imunog sistema domaćina i usled nestabilnosti RNK polimeraze virusa. Ovaj proces je poznat kao „antigenski drift” (Cheng i sar., 2012; Das i sar., 2010).

Pored mutacija, influenza A viruse karakteriše velika genetička varijabilnost koja nastaje kao posledica genskih resortiranja. U toku ovog procesa dolazi do razmene genskih segmenata virusa koji inficiraju jednu ćeliju, pri čemu novonastali virioni nasleđuju segmente gena koji su istovetni roditeljskim. To u teoriji znači da ukoliko dva virusa inficira jednu ćeliju, moguće je da nastane  $2^8$  (= 256) različitih kombinacija genskih RNK segmenata. Ovaj proces je poznat kao „antigenski šift” (Capua i Alexander, 2002).

### **2.2.2. Morfologija virusa influence**

Influenca virusi poseduju omotač u vidu dvostruke lipidne ovojnice. Najistaknutija karakteristika virusnog omotača jeste postojanje dva tipa glikoproteina koja su gusto zbijeni: trimeri štapićastog oblika hemaglutinina i tetrameri pečurkastog oblika neuraminidaze. Genom influenza A virusa čini jednolančana RNK, negativnog polariteta sa segmentiranim genomom (Taubenberger i Kash, 2010). Virion virusa influence je pleomorfan, može biti različitog oblika i veličine, od sferičnog do izduženih filamentoznih formi, u zavisnosti od soja virusa. Virioni sferičnog oblika dijametra su oko 100 nm, dok su filamentozni virioni dužine oko 20 nm i dijametra 100 nm. Novija istraživanja su dokazala da obe forme influenza virusa (sferična i filamentozna) sadrže samo jednu kopiju virusnog genoma (Calder i sar., 2010; Noda i sar., 2006; Rossman i sar., 2010). Genom virusa influence A poseduje 8 segmenata (1-8) koji kodiraju 11 virusnih proteina, uključujući 4 polimerazna proteina, protein nukleokapsida (NP), hemaglutinin (HA), neuraminidazu (NA), dva proteina matriksa (M1 i M2) i dva nestrukturna proteina (NS1 i NS2) (slika 2) (Wong i Yuen, 2006).



- |    |      |
|----|------|
| 1. | PB 2 |
| 2. | PB 1 |
| 3. | PA   |
| 4. | HA   |
| 5. | NP   |
| 6. | NA   |
| 7. | M    |
| 8. | NS   |

**Slika 2.** Shematski prikaz građe influenza A virusa (Webster i sar., 1992)

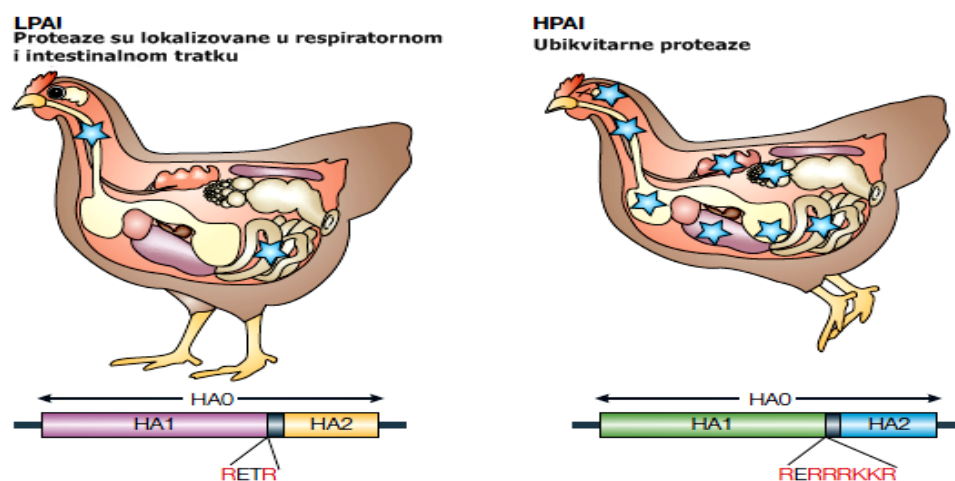
U virionu je inkorporirano devet od ukupno deset polipeptida. Tri polipeptida su smeštena u lipidnom omotaču: HA i NA i u maloj količini nalazi se M2 protein. Ispod omotača nalazi su matriks protein, označen kao M1 koji čini glavnu strukturnu komponentu viriona (Portela i Digard, 2002). Osam segmenata jednolančanog RNK molekula nalazi se unutar virusnog omotača i u tesnoj je vezi sa nukleoproteinom i četiri proteina polimeraze (PB2, PB1, PA, PB1-F2), pri čemu zajedno formiraju ribonukleoproteinski kompleks (RNP). RNP kompleks je minimalna funkcionalna jedinica replikacije i odgovoran je za transkripciju informacione RNK (mRNK), sintetisanje komplementarne RNK (cRNKs) i transkripciju cRNKs u virusnu RNK (vRNKs) (Lee i Saif, 2009).

Prvi segment nosi informaciju za sintezu polimeraza baznog proteina 2 (PB2). PB2 učestvuje u inicijaciji procesa transkripcije virusne mRNK, kao protein koji prepoznaje i vezuje se za 5' cap strukture mRNK domaćina. Polimeraza PB1 je kodirana drugim segmentom RNK. U polimeraznom kompleksu učestvuje kao protein odgovoran za elongaciju polinukleotidnog lanca. Pojedini sojevi virusa influence poseduju dodatni

polimerazni protein, PB1-F2 koji je transkribovan sa drugog rama za čitanje (*eng.* reading frame) u PB1. Ovaj protein je zadužen za indukciju apoptoze ćelija imunog sistema domaćina (Rossman i Lamb, 2011).

Polimeraza kiseli protein - PA polimeraza (*eng.* polymerase acidic protein) je kodirana trećim segmentom RNK. Pored PB1 i PB2 takođe je u sastavu RNK polimeraznog kompleksa. Njen N domen poseduje RNK endonukleaznu aktivnost koja je neophodna za mehanizam „cap-snatching”, koji omogućava inicijaciju transkripcije (Jagger i sar., 2012; Zheng i Tao, 2013). Pored toga, poseduje i proteaznu aktivnost (Das i sar., 2010).

Četvrtim segmentom RNK kodiran je protein hemaglutinin. Hemaglutinin (HA) je integralni membranski protein i glavni površinski antigen viriona virusa influence. Ima ključnu ulogu u vezivanju za ćelijske receptore i fuziji virusne ovojnice sa ćelijskom membranom. Glikoprotein virusa avijarne influence hemaglutinin stvara se kao prekursor HA0 i zahteva post-translaciono cepanje od strane proteaza domaćina kako bi virus postao infektivan (slika 3) (Rott, 1992).



**Slika 3.** Hemaglutinin je glavna determinanta patogenosti kod živine. Prekursor hemaglutinina HA0 nisko patogenih sojeva (LPAI) na mestu cepanja poseduje 2 molekula arginina (na pozicijama 1 i 4 - **RETR**), i cepaju ga proteaze koje su lokalizovane u respiratornom i crevnom sistemu (označeno plavim zvezdicama) rezultirajući lokalizovanom infekcijom. U suprotnosti sa tim, prekursor HA0 HPAI virusa poseduje višestruke bazne amino kiseline na mestu cepanja (**RERRRKKR**), pri čemu može da ih cepa veći broj ubikvitarnih proteaza koje su lokalizovane u više različitih organa. Kao rezultat nastaje sistemska infekcija (prilagođeno prema Horimoto i Kawaoka, 2005).

Protein prekursor HA0 nisko patogenih sojeva virusa AI poseduje jedan molekul arginina na mestu cepanja a drugi na poziciji 4. Nisko patogeni (LPAI) virusi imaju limitiran broj mesta cepanja od strane proteaza domaćina (kao što su enzimi slični tripsinu) što uzrokuje njihovo ograničeno mesto replikacije - u respiratornom i crevnom sistemu, gde se obično nalaze ovi enzimi. Visoko patogeni virusi (HPAI) na mestu cepanja HA0 poseduju višestruke bazne amino kiseline (arginin i lizin), što nastaje kao posledica insercije ili substitucije i mogu da ih cepaju ubikvitarnе proteaze, od kojih je furin na prvom mestu (slika 3).

Nukleoprotein (NP) je kodiran petim segmentom RNK. To je drugi po zastupljenosti protein u virionu virusa influence i jedan je od proteina koji se u inficiranoj ćeliji stvara u najvećoj količini. Predstavlja glavnu metu citotoksičnih T limfocita domaćina (Webster i sar., 1992).

Neuraminidaza (NA) je kodirana šestim segmentom RNK. Pored hemaglutinina takođe je integralni membranski glikoprotein i drugi glavni površinski antigen viriona. Uloga mu je u oslobađanju virusnih čestica. Neuraminidaza je antigenski varijabilan protein, na osnovu čega postoji podela influenza A virusa na podtipove N1-N11.

Sedmi segment genoma nosi informaciju za sintezu 2 proteina označena kao M1 i M2. Najzastupljeniji virusni protein u virionu influenza virusa je protein M1. Matriks protein formira mrežu ispod virionske ovojnice i okružuje nukleokapside. U inficiranoj ćeliji nalazi se u citoplazmi i nukleusu. Još uvek nije poznata njegova enzimaska aktivnost ali se pretpostavlja da ima primarnu ulogu u formiranju virusnih čestica (Webster i sar., 1992). Integralni membranski protein M2, takođe je kodiran sedmim segmentom RNK. Ovaj protein igra ulogu kao jonski kanal, kako bi se kontrolisao pH tokom sinteze hemaglutinina i kako bi došlo do acidifikacije unutrašnjosti viriona čime je omogućeno oslobađanje virusne RNK iz RNP kompleksa. Protein M2 ima takođe ulogu u formiranju i pupljenju virusnih čestica (Rossman i Lamb, 2011).

Osmi segment RNK kodira dva proteina: nestrukturani NS1 i protein NS2. Ovi proteini se u velikoj količini nalaze u inficiranim ćelijama: NS1 primarno u nukleusu dok se NS2 nalazi u citoplazmi, ali nije inkorporiran u virione. Od svih 11 proteina koji su kodirani od strane 8 RNK segmenata, jedino je NS1 protein nestrukturani i nije pripojen

virionu. To je regulatorni protein i ima nekoliko uloga. Regulator je translacije i splajsinga informacione RNK i igra veoma bitnu ulogu u borbi protiv ćelijskog imunog odgovora domaćina. Odgovoran je za patogenost virusa influence i smatra se target proteinom za atenuaciju prilikom formiranja vakcina (Lee i Saif, 2009). Protein NS2 se još naziva i jedarni izvozni protein (*eng.* nuclear export protein - NEP) jer ima ulogu u posredovanju u transportu novosintetisanih RNP kompleksa iz jedra.

### **2.2.3. Otpornost virusa na fizičke i hemijske agense**

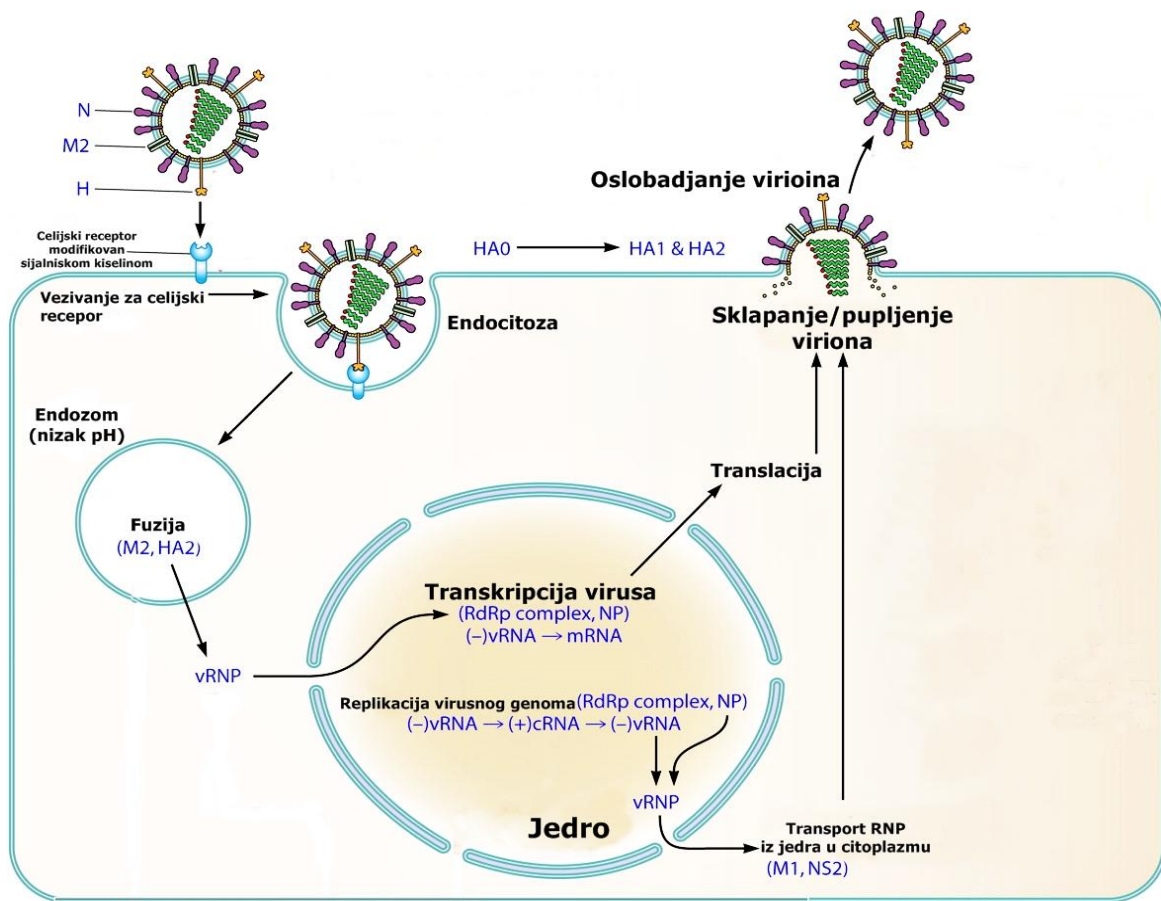
Influenca A virusi poseduju lipidni omotač što ih čini neotpornim na veliki broj dezinficijenas. Dezinficijensi koji uspešno inaktiviraju virus avijarne influence mogu se podeliti na sapune i deterdžente, baze, hloride, oksidaciona sredstva, aldehide, fenole, kvaternarna amonijumova jedinjenja i alkohole. Većina dezinficijenas ispoljava svoju efikasnost na temperaturama iznad 20°C, što ukazuje na to da je temperatura veoma važan faktor koji utiče na efikasnost procesa dezinfekcije (Benedictis i sar., 2007). Jonizujuće zračenje, pre svega gama-protonsko zračenje dovodi do oštećenja virusne RNK i pokazuje veliku efikasnost u inaktivaciji virusa influence. Hladnoća povoljno utiče na aktivnost i otpornost virusa i dokazano je da na temperaturi od 4°C virus može preživeti i preko 1300 dana. Sa druge strane, delovanjem toplote stabilnost virusa se smanjuje. Direktna sunčeva svetlost, pri spoljašnjoj temperaturi od 32-35°C inaktiviraju virus influence za 30 minuta. Niža temperatura pasterizacije od 57°C uništava virus za 10 minuta dok ga viša temperatura od 62°C uništava za 5 minuta. Na preživljavanje virusa u vodi, pored temperature vode značajno utiču i pH vode kao i salinitet. Visok pH kao i povišen salinitet vode negativno se odražavaju na preživljavanje virusa. U perju, virus može da preživi 15 dana na temperaturi od 20°C, i do 200 dana na temperaturi od 4°C (USDA, 2015).

### 2.3. REPLIKACIJA VIRUSA INFLUENCE

Ulazak virusa influence u ćeliju je specifičan proces koji podrazumeva prepoznavanje odgovarajućih receptora na površini ćelija domaćina (Boyce i sar., 2009). Virus influence kao receptore koristi ćelijske proteine koji su modifikovani sijalinskom kiselinom. Glavnu ulogu u povezivanju virusa za receptore ćelija domaćina imaju molekuli HA koji poseduju receptor-vezujuće sekvence. Površinski glikoproteini - hemaglutinin i neuraminidaza su glavne determinante za interspecijsku transmisiju, kao i za adaptaciju virusa influence A za nove domaćine. Hemaglutinin se vezuje za sijalinsku kiselinu koja je povezana sa membranskim glikoproteinima ili glikolipidima. Sijalidazna aktivnost neuraminidaze olakšava oslobađanje i difuziju novostvorenih viriona. Sijalinska kiselina ostvaruje vezu sa molekulom galaktoze na položaju 3 ( $\alpha$ 2,3 veza) ili 6 ( $\alpha$ 2,6 veza). Avijarni influenza virusi su predisponirani za vezivanje na  $\alpha$ 2,3 sijalinsko-galaktozne veze, dok su humani sojevi virusa adaptirani na  $\alpha$ 2,6 sijalinsko-galaktozne veze (Munier i sar., 2010). Nakon vezivanja viriona za ćeliju domaćina, virus ulazi u ćeliju procesom endocitoze (slika 4).

Nizak pH u endozomalnom sistemu pokreće konformacione promene u hemaglutininu, pri čemu dolazi do insercije hidrofobnog kraja HA2 u vezikularnu membranu i fuzije virusa i vezikularne membrane. Procesom fuzije oslobađaju se virioni u citoplazmu ćelije domaćina (Webster i sar., 1992). Dokazano je da je za obe forme virusa influence – sferičnu i filamentoznu, za ulazak u ćeliju neophodna endozomalna acidifikacija. Nizak pH u endozomu je neophodan kako zbog fuzije HA za virusne endozomalne membrane tako i za aktivaciju M2 jonskog kanala. Proton-selektivni M2 jonski kanal posreduje u provodljivosti protona u unutrašnjost viriona, dovodeći do odvajanja RNP jezgra od proteina M1 što je osnova za početak procesa replikacije. Proces formiranja novih viriona odvija se na lipidnim splavovima (*eng.* lipid rafts) koji se nalaze na apikalnim delovima plazma membrane (Rossman i Lamb, 2011).





**Slika 4.** Vezivanje virusa influence za ćeliju domaćina i replikacioni ciklus virusa (prilagođeno prema Cheng i sar., 2012).

Još uvek nije poznat mehanizam kojim virus influence pokreće proces endocitoze. Novija istraživanja ukazuju da vezivanjem sferičnih virusnih čestica za površinu ćelije dolazi do aktivacije receptora tirozin kinaze (kao što je receptor epidermalnog faktora rasta), što dovodi do pokretanja celularnog signala koji rezultira *de novo* stvaranjem klaritinom obloženih udubljenja, putem kojih virus ulazi u ćeliju. Filamentozne forme virusa influence zahtevaju drugačiji mehanizam za ulazak u ćeliju domaćina. Zbog svojih dimenzija virusi filamentoznog oblika prodiru u ćeliju procesom makropinocitoze (Rossman i Lamb, 2011).

Influenca virusi se replikuju u jedru inficirane ćelije. U toku replikacije, nukleokapsid roditeljskog virusa migrira u jedro ćelije domaćina, gde kompleks polimeraza započinje transkripciju mRNK. Primarni transkripti se koriste za translaciju virusnih proteina, gde su u ranim fazama infekcije najzastupljeniji NP i NS1. Nakon toga dolazi do obustavljanja translacije mRNK domaćina. Novosintetisani NP i NS1 migriraju u nukleus. Pretpostavlja se da je povećana koncentracija slobodnog NP okidač za preokret od sinteze mRNK do cRNK i vRNK. Novosintetisani vRNK unutar nukleusa funkcionišu kao šablon za sekundarnu transkripciju virusne mRNK. Kasnije u toku infekcije glavni produkti translacije su M1, HA i NA protein. Posttranslaciono se HA i NA obrađuju i transportuju na ćelijsku površinu, gde se integrišu u ćelijsku membranu. Finalni korak u maturaciji virusa influence odigrava se ekstracelularno. Dejstvom ćelijskih proteaza domaćina dolazi do razdvajanja proteina HA na HA1 i HA2. Influenca virus koristi lipidne splavove u plazma membrani inficirane ćelije kao mesto sklapanja i pupljenja novih viriona virusa. Lipidni splavovi su delovi plazma membrane različite veličine, građeni od holesterola i sfingolipida. Lipidni splavovi koncentrišu proteine unutar jasno definisanih delova plazma membrane i predstavljaju njene funkcionalne delove.

## **2.4. PATOGENEZA**

Mehanizam kojim virus avijarne influence oštećuje ćelije domaćina i dovodi do smrti ćelije jeste putem nekroze ili apoptoze (Hooper i Selleck, 1998; Perkins i Swayne, 2003). Usled povećane virusne replikacije, dolazi do nakupljanja virusnog nukleoproteina u citoplazmi i jedru inficiranih ćelija, što rezultira pojavom nekroze. Kod pilića inficiranih virusom avijarne influence, nekroza se najčešće pojavljuje na moždanim neuronima, tubularnim ćelijama bubrega, epitelnim acinarnim ćelijama pankreasa, miocitima i pulmonalnim epitelnim ćelijama (Suarez i sar., 1998). Do smrti ćelija i apoptoze dolazi usled povećane ekspresije citokina i to prvenstveno interferona beta (IF $\beta$ ) i transformišućeg faktora rasta beta (TGF $\beta$ ) (Hinshaw i sar., 1994; Schultz-Cherry i Hinshaw, 1996;

Takizawa i sar., 1995). Inicijalno mesto replikacije nisko patogenih sojeva avijarne influence je nosna šupljina, odakle se virus širi u ostale delove respiratornog i crevnog sistema. Teža klinička slika se javlja ukoliko se udruže sekundarne bakterijske, gljivične ili virusne infekcije. Veoma retko se nisko patogeni sojevi šire sistemski, dovodeći do oštećenja epitelnog tkiva visceralnih organa, kao što su bubrezi, pankreas i jajovod (Bano i sar., 2003). Ukoliko kod pilića dođe do direktne intranazalne infekcije visoko patogenim sojevima, 24 sata nakon izlaganja virusu nazalni epitel je nekrotičan, submukozni sloj je inflamiran, a virus se može detektovati u endotelnim ćelijama kapilara.

Ćelije inflamacije, uglavnom makrofagi i heterofili, igraju bitnu ulogu u inicijalnoj replikaciji i diseminaciji virusa avijarne influence, kao i u replikaciji virusa unutar endotelnih ćelija. Viremijom dolazi do diseminacije i replikacije virusa u različitim tipovima parenhimatoznih ćelija unutar mozga, visceralnih organa kao i kože. Ukoliko do infekcije dođe intranazalnim putem, replikacija većine visoko patogenih sojeva virusa influence se dešava unutar 24 sata u visceralnim organima. Nakon inficiranja, 48 sati, virusni titar može dostići maksimalan nivo i mogu se detektovati teška oštećenja tkiva. Međutim, pojedini visoko patogeni sojevi virusa influence zahtevaju duži vremenski period za nastanak bolesti i smrti. Kod ovakvih sojeva virusa influence replikacija u vaskularnim endotelnim ćelijama izostaje ili je na minimalnom nivou, ali ovi sojevi imaju tendenciju da se replikuju u parenhimskim ćelijama visceralnih organa. HPAI virusi uglavnom dovode do povećane vaskularne permeabilnosti i oštećenja vaskularnih endotelnih ćelija, što rezultira pojavom edema, hemoragija i mikrotromboze. U pojedinim slučajevima, vaskularna oštećenja mogu dovesti do diseminovane intravaskularne koagulopatije, trombocitopenije i poremećaja u zgrušavanju krvi. Ukoliko inficirani pilići prežive perakutnu fazu infekcije (1-2 dana nakon inficiranja), dolazi do širenja i replikacije virusa u različitim organima, uzrokujući multi-organska oštećenja. Do smrti dolazi usled oštećenja mozga, autonomnog nervnog sistema, miokarda i pankreasa. Patofiziološki mehanizmi kojima virus avijarne influence oštećuje organe uključuju: direktnu virusnu replikaciju u ćelijama i tkivima; indirektno, usled povećane produkcije ćelijskih medijatora zapaljenja kao što su citokini; i nastanak ishemije usled vaskularne tromboze.

Smatra se da je prekomerna produkcija citokina kod HPAI infekcija odgovorna za sistemska vaskularna oštećenja. Inflammatory citokini uzrokuju slabljenje čvrstih veza (*eng.* tight junction) između endotelnih ćelija dovodeći do hipervaskularne permeabilnosti. Pored toga, inflamatorni citokini kao što su IL-1 $\beta$ , IL-6, i TNF- $\alpha$  pokreću koagulacioni sistem u toku inflamacije i infekcije. Muramoto je dokazao da kod pilića infekcija H5N1 virusom pokreće aktivaciju tkivnog faktora (TF) i proces koagulopatije (Muramoto i sar., 2006). Tkivni faktor (TF) je eksprimiran na vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama i fibroblastima i proizvode ga makrofagi i endotelne ćelije nakon stimulacije inflamatornim citokinima (Kuribayashi i sar., 2013).

Nekroze su dominantna lezija u akutnom toku bolesti i nastaju kao rezultat vaskularnih oštećenja kao što su tromboza i embolija, dovodeći do infarkta, naročito u koži. Nekroze i posledično inflamacija takođe mogu da nastaju kao rezultat direktnog umnožavanja virusa u parenhimskim ćelijama u većini visceralnih organa, nervnom sistemu i koži (Hooper i Selleck, 1998). Vaskularna oštećenja prouzrokuju pojavu edema, kongestija i hemoragija koja se manifestuju kao crvenilo i otok glave, nogu i stopala (Narayan, 1972). Subtipovi visoko patogene avijarne influence mogu biti epiteliotropni, endoteliotropni, neurotropni ili pantropni, u zavisnosti od vrste ptica domaćina. Na primer, soj A/turkey/Ontario/7732/1966 podtip H5N9 je neurotropan, ali se ne replikuje u vaskularnom endotelu kod ćuraka (Narayan, 1972). Neuropatogenost visoko patogenih sojeva avijarne influence objašnjava se sledećim mehanizmima:

- Direktno širenje virusa iz epitela posteriorne nazalne šupljine putem olfaktornog nerva do olfaktornog bulbosa i prednjeg mozga;
- Diseminacija virusa kardiovaskularnim sistemom do parenhima mozga, gde dovodi do nastanka nekroza i mikroglioze;
- Infekcija endodimalnih ćelija rezultira pojavom ventrikulitisa i periventrikularne nekroze i inflamacije.

## 2.5. KLINIČKA SLIKA

Infekcije izazvane nisko patogenim sojevima avijarne influence kod galiformnih vrsta obično dovode do morbiditeta oko 50% u jatu, dok je stepen mortaliteta nizak (5%). Stopa mortaliteta može biti viša ukoliko se jave sekundarni patogeni (Bertran i sar., 2014). Klinička slika kod infekcija izazvanih nisko patogenim sojevima varira u zavisnosti od soja virusa, vrste i uzrasta ptica, a uglavnom se pojavljuju patofiziološki poremećaji u respiratornom, digestivnom, urinarnom i reproduktivnom sistemu. Kod kokošaka nosilja se može javiti pad nosivosti, *egg peritonitis*, pojačana lakrimacija, kašljanje i kijanje (Cardona i sar., 2009). Generalno, kod galiformnih vrsta uočava se smanjena aktivnost, gubitak telesne mase, gomilanje u grupe. Ptice su letargične, smanjena je konzumacija hrane i vode što posledično dovodi do smanjenja telesne mase, a povremeno se može pojaviti i dijareja. Iako je dokazana replikacija LPAI virusa kod komercijalnih pilića, ovi klinički znaci nisu opisani kod SPF pilića (Webby i sar., 2002).

Pojedina istraživanja dokazuju da su fazani i prepelice osetljiviji na LPAI infekcije u odnosu na piliće (Humberd i sar., 2006; Perez i sar., 2003; Spackman i sar., 2010). Prirodne LPAI infekcije protiču uglavnom asimptomatski ali su kod morki opisani respiratorni znaci, konjunktivitis pa čak i neurološki znaci u vidu opistotonusa, tortikolisa i paralize krila (Mutinelli i sar., 2003). U eksperimentalnim uslovima, LPAI infekcije ne dovode do mortaliteta i morbiditeta kod galiformnih vrsta ptica (Bertran et al., 2013; Bertran i sar., 2011; Humberd i sar., 2006, 2007; Makarova i sar., 2003; Perez i sar., 2003; Thontiravong i sar., 2012). Ipak, pojedini podtipovi virusa avijarne influence kao što su H9N2 i H10, mogu dovesti do nespecifičnih kliničkih znakova bolesti u vidu smanjene aktivnosti, nakostrešenog perja, kašlja i kijanja, dijareje i pada nosivosti kod prepelica (Bonfante i sar., 2013; Ebrahimi i sar., 2011; Lavoie i sar., 2007; Makarova i sar., 2003; Nili i sar., 2007). Kod divljih ptica vodenih staništa infekcije nisko patogenim sojevima su asimptomatske. U eksperimentalnim istraživanjima dokazano je da nisko patogeni virusi inficiraju epitelne ćelije u crevnom sistemu i da se izlučuju putem fecesa. U istraživanjima

Lauderta i saradnika, dokazano je da se kod divljih pataka može javiti smanjena proizvodnja jaja (Laudert i sar., 1993c).

Infekcije izazvane visoko patogenim sojevima avijarne influence dovode do visokog morbiditeta i mortaliteta koji može da bude i do 100% u jatu. Klinička slika većinom zavisi od soja virusa avijarne influence i od vrste ptica koja je inficirana. Prvi klinički znaci su uglavnom nespecifični i uključuju anoreksiju, letargiju i nakostrešeno perje (Bertran i sar., 2013; Bertran i sar., 2011; Jeong i sar., 2009; Perkins i Swayne, 2001; Mutinelli i sar., 2003). Kako infekcija napreduje, kliničku sliku prate nervni simptomi u vidu otežane motoričke funkcije (pareza ili paraliza nogu i krila, nemogućnost stajanja, gubitak balansa, inkoordinacija, lepršanje krilima). Vestibularne disfunkcije se manifestuju tortikolisom, nistagmusom, tremorom glave i vrata, konvulzijama, opistotonusom i vrtenjem u krug (Bertran i sar., 2013; Bertran i sar., 2011; Isoda i sar., 2006; Mutinelli i sar., 2003). Na kraju, smrt se može javiti kao rezultat neurološke disfunkcije udružene sa multiorganskim oštećenjima (Bertran i sar., 2013; Bertran i sar., 2011; Perkins i Swayne, 2001). Znaci oboljenja nervnog sistema se najčešće javljaju u toku akutnog i subakutnog toka bolesti (3-10 dana). Pojava nervnih simptoma bolesti zavisi od vrste ptica kao i od virulencije virusa influence. Neurološki znaci nisu patognomonični za infekcije visoko patogenim sojevima virusa avijarne influence, već mogu da nastanu kao posledica infekcije velogenim sojem Newcastle bolesti, drugim infektivnim i neinfektivnim uzročnicima (Pantin-Jackwood i Swayne, 2009).

Razlike u kliničkoj slici među različitim vrstama domaće živine su detaljno opisane. Perkins i Swayne (2001) su opisali da depresija kod morki i prepelica značajno napreduje nekoliko sati pred smrt jedinki; kod fazana i jarebica depresija traje znatno duže i obično je udružena sa jakim neurološkim simptomima. Pored ovoga opisani su i gastrointestinalni simptomi bolesti kao što su pojačana defekacija i izbacivanje urata, kao i pojava mukozne dijareje (Perkins i Swayne, 2001). Pojedina istraživanja su pak dokazala pojavu minimalnih kliničkih simptoma bolesti, čak i pojavu iznenadne smrti bez ispoljavanja kliničkih simptoma kod prepelica (Jeong i sar., 2009; Perkins i Swayne, 2001; Saito i sar., 2009).

Perakutni tok bolesti je najčešće zabeležen kod kokošaka i ćurki u odnosu na druge galiformne vrste, dok su klinički znaci i tok bolesti slični kod svih vrsta. Kod galiformnih vrsta, respiratorne smetnje su ređe zastupljene nego kod infekcija izazvanih nisko patogenim sojevima (Pantin-Jackwood i Swayne, 2009). Kod infekcija izazvanih HPAI sojevima virusa influence zbog visoke stope mortaliteta, diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze: Newcastle bolest, infektivni laringotraheitis i akutna trovanja. Takođe, diferencijalno dijagnostički smatraju se i infekcije hlamidijom i mikoplazmama.

## **2.6. PATOMORFOLOŠKE PROMENE**

### **2.6.1 Makroskopske promene**

Patomorfološke promene nastaju kao rezultat virusne replikacije unutar ćelija. Sa porastom titra replikujućih virusnih čestica, javljaju se teže patomorfološke lezije, velika oštećenja ćelija i smrt ukoliko su infekcije izazvane visoko patogenim sojevima (Swayne, 2007). Za razliku od LPAI infekcija koje obično nisu praćene patomorfološkim promenama kod galiformnih vrsta, infekcija HPAI virusima dovodi do različitih promena koje su stalno nalaz i obično se podudaraju sa kliničkim stanjem bolesti. Kod ptica koje uginu iznenada bez ispoljavanja kliničkih simptoma bolesti, patomorfološke promene na organima mogu da izostanu. Ipak, najizraženije lezije javljaju se kod ptica uginulih nakon uznapredovalog toka bolesti (Bertran i sar., 2013; Perkins i Swayne, 2001).

Pojava lezija izazvanih visoko patogenim sojevima avijarne influence variraju u zavisnosti od soja virusa kao i od vrste ptica koja je zahvaćena infekcijom. Uobičajeno infekcije HPAI virusima zahvataju više visceralnih organa, kardiovaskularni, nervni sistem i kožu, dovodeći do nekroza, edema i hemoragija. U akutnoj fazi infekcije kod obolelih ptica se može javiti nakostrešenost perja, otok kreste, podbradnjka, periorbitalne regije i nogu, udruženih sa subkutanim hemoragijama, naročito u delovima kože koji nisu

prekriveni perjem. Pojedini sojevi virusa dovode do edema i hiperemije konjunktiva, očnih kapaka i traheje. Na kresti i podbradnjacima mogu se uočiti fokalne nekroze, petehije ili ehimoze, kao i cijanoza. Nastanku cijanoza prethode ishemične nekroze nastale vaskularnim infarktima. Hemoragije i nekroze se mogu pojaviti na seroznim i mukoznim površinama većine visceralnih organa. Čest nalaz su hemoragije u masnom tkivu srca kao i u epikardijumu, mukozi proventrikulusa i ventrikulusa, kao i u grudnoj muskulaturi. Ne tako čest nalaz jesu hemoragije u cecalnim tonzilama, Mekelevom divertikulumu i unutrašnjoj površini sternuma. Nekroze i krvarenja na pankreasu se pojavljuju u vidu crvenih do braon polja. Kod kokošaka nosilja može doći do rupture jajnika i oslobađanja žumanca u celomsku duplju. Većina HPAI virusa dovodi do nekroze i krvarenja u Pajеровim pločama u tankom crevu, težak oblik edema i hemoragija može biti prisutan u plućima i povremeno se može javiti edem mozga. Bela nekrotična polja mogu se uočiti u srcu i povremeno u jetri i bubrezima. Zajedno sa pojavom nekroze u bubrezima može doći do nakupljanja urata. Na plućima se najčešće javljaju edem i intersticijalna pneumonija, kongestija i hemoragije. Kod mladih ptica može se javiti krvarenje i atrofija primarnih limfatičnih organa (burza fabricii i timus). Slezina može biti uvećana ili normalne veličine, sa bledim nekrotičnim poljima na površini (Pantin-Jackwood i Swayne, 2009).

## **2.6.2. Patohistološke promene**

Iz razloga što se kod infekcija izazvanih LPAI virusima klinički znaci retko javljaju, malo je histopatoloških ispitivanja rađeno kod pojedinih galiformnih vrsta. Većina informacija o patohistološkim lezijama dobijena je u uslovima veštačke infekcije, intranazalnom inokulacijom LPAI sojeva virusa. Mikroskopske lezije su detektovane uglavnom oko 7 dana nakon inficiranja i to pretežno u traheji, plućima i duodenumu. Lezije su u vidu heterofilnog-limfocitnog traheitisa, blagog bronhitisa, limfocitne i heterofilne infiltracije bronhiola, blage kongestije pluća kao i duodenitisa sa infiltracijom heterofila i monocita (Bertran i sar., 2014).



U većini infekcija izazvanih HPAI virusima, mikroskopske promene na organima su učestaliji nalaz u odnosu na makroskopske promene. Patohistološke lezije variraju u zavisnosti od soja virusa, načina ulaska virusa u organizam i same vrste ptice. Najzastupljenije histološke promene su u vidu nekroza ili inflamacije u većini organa. Promenama su najviše zahvaćeni koža (uključujući i folikule perja), mozak, srce, pankreas, pluća, nadbubrežne žlezde, kao i primarni i sekundarni limfatični organi. U perakutnoj fazi bolesti, mikroskopske lezije uglavnom izostaju u većini organa, ali povremeno se mogu javiti multifokalne nekroze i inflamacija. Virus je prvenstveno prisutan u vaskularnim endotelnim ćelijama i miocitima.

U akutnoj fazi bolesti u većini visceralnih organa javljaju se multifokalna nekrotična polja, udružena sa inflamacijom, hemoragijama i edemom. Kod ptica kod kojih infekcija duže traje, nekroze su manje zastupljen nalaz u odnosu na inflamatorne promene. Antigen virusa avijarne influence se pojavljuje u nekrotičnim poljima ili delovima tkiva zahvaćenim inflamacijom, ali se ne može detektovati u apoptičnim limfocitima. Kod galiformnih vrsta ptica pojava inflamacije u parenhimatoznim organima je dominantniji nalaz od pojave nekroze (Pantin-Jackwood i Swayne, 2009). Najčešće histološke lezije na organima kod galiformnih vrsta ptica inficiranih HPAI virusima prikazane su u tabeli 3.

**Tabela 3:** Najčešće patohistološke lezije na organima galiformnih vrsta ptica izazvanih visoko patogenim sojevima virusa avijarne influence (prilagođeno prema (Pantin-Jackwood i Swayne, 2009).

<b>Organ</b>	<b>Histološki nalaz</b>	<b>Reference</b>
Nosna šupljina	Nekroza epitelnih ćelija, rinitis, sinuzitis	(Jones i Swayne, 2004)
Traheja	Traheitis	(Shalaby i sar., 1994 ) (Swayne i Pantin-Jackwood, 2006) (Mo i sar., 1997)
Pluća	Edem, kongestija, hemoragije, pneumonija, bronchitis	(Shalaby i sar., 1994), (Swayne, 1997),(Swayne i Pantin-Jackwood, 2006) (Mo i sar., 1997)
Srce	Nekroza miocita, miokarditis	(Cauthen i sar., 2000), (Kobayashi i sar., 1996a), (Suarez i sar., 1998) (Swayne, 1997) (Jones i Swayne, 2004) (Mo i sar., 1997) (Perkins i Swayne, 2001)
Mozak	Edem, nekroza neurona, gliozna, perivaskularno nakupljanje, meningoencefalitis	(Mo i sar., 1997) (Perkins i Swayne, 2001) (Kobayashi i sar., 1996b) (Bröjer i sar., 2012)
Crevni sistem	Hemoragije, deplecija limfocita, nekroza epitela, enteritis	(Swayne, 1997) (Jones i Swayne, 2004) (Mo i sar., 1997) (Perkins i Swayne, 2001) (Swayne, 1997)
Pankreas	Vakuolizacija, nekroza acinusnih epitelnih ćelija, pancreatitis	(Swayne, 1997) (Jones i Swayne, 2004) (Mo i sar., 1997) (Perkins i Swayne, 2001) (Teifke i sar., 2007)
Slezina	Deplecija limfocita, nekroze, splenitis, hiperplazija makrofaga	(Cauthen i sar., 2000), (Suarez i sar., 1998), (Swayne, 1997) (Jones i Swayne, 2004) (Mo i sar., 1997) (Perkins i Swayne, 2001)
Burza fabricii, timus, cecalne tonzile	Deplecija limfocita, hiperplazija fagocita, nekroze, hemoragije	(Swayne, 1997) (Perkins i Swayne, 2001)
Nadbubrežne žlezde	Adenitis, nekroza	(Jones i Swayne, 2004)
Integument	Subkutani edem, nekroza epidermisa i folikula perja	(Perkins i Swayne, 2001)
Kostna srž	Celularna deplecija, nekroza	(Mo i sar., 1997) (Perkins i Swayne, 2001)
Skeletni mišići	Degeneracija miofibrila i nekroza	(Perkins i Swayne, 2001), (Swayne, 1997) (Jones i Swayne, 2004) (Mo i sar., 1997)
Bubrezi	Nekroza tubula, intersticijalni nefritis	(Swayne, 1997) (Mo i sar., 1997)
Jetra	Hepatocelularna nekroza	(Perkins i Swayne, 2001)
Reproduktivni organi	Nekroza, salpingitis, ooforitis	(Capua i sar., 2000)

## 2.7 IMUNI ODGOVOR

Mogućnost da virus avijarne influence dovede do oboljenja kao i sposobnost jedinke da odgovori na infekciju veoma se razlikuje među životinjskim vrstama. Na primeru galiformnih vrsta ptica, u pojedinim istraživanjima dokazano je da virusi koji su visoko patogeni za piliće, dovode do blage infekcije kod tri različite vrste pataka (Alexander i sar., 1978; Cooley et al., 1989; Wood i sar., 1985). Razlike u patogenosti kod različitih galiformnih vrsta dokazane su u eksperimentalnim infekcijama sa LPAI i HPAI virusima. Na primer, u eksperimentalnoj infekciji pilića i ćuraka sa dva LPAI izolata, kod pilića je uočena asimptomatska infekcija dok je kod ćuraka zabeležen mortalitet do 25% (Laudert i sar., 1993b). Razlike se uočavaju i u imunom odgovoru na virus influence kod različitih vrsta ptica, naročito u pogledu titra antitela. U komparativnim istraživanjima imunog odgovora različitih vrsta ptica inficiranih virusom influence dokazano je da je najviši titar antitela zabeležen kod pilića, zatim kod fazana, ćuraka, prepelica i najniži kod pataka. Sličan imunološki odgovor je dobijen i kod jedinki vakcinisanih inaktivisanim sojevima virusa influence kao i u eksperimentalnim infekcijama virusom influence (Suarez i Schultz-Cherry, 2000).

Humoralni imuni odgovor kod živine prirodno inficirane virusom influence uključuje sistemsku kao i mukoznu produkciju antitela. Sistemska produkcija antitela kod pilića i ćurki je slična kao i kod drugih ptica, gde se prvo detektuju IgM antitela - oko 5 dana posle infekcije kao i produkcija IgY, nedugo posle toga. IgY antitela su ekvivalentna IgG antitelima kod sisara i predstavljaju glavnu klasu antitela u krvi. Stvorena antitela su usmerena protiv različitih virusnih proteina, a veoma su značajna kako za aspekta zaštite od bolesti, tako i zbog dijagnostike bolesti.

Površinski proteini virusa influence su jedini antigeni sposobni da indukuju neutrališuća antitela i protektivan imuni odgovor. Dokazano je da specifična HA antitela stvorena u toku LPAI infekcije pružaju potpunu zaštitu u slučaju reinfekcije sa istim sojem virusa. Ova pojava se naziva homosubtipski imunitet. Sa druge strane, delimičnu zaštitu pružiće antitela u slučaju reinfekcije sa različitim sojem virusa i ova pojava se definiše kao

heterosubtipski imunitet (Verhagen, 2016). Antitela stvorena na HA protein virusa influence su glavna determinanta zaštite protiv bolesti i zato je kod živine proizvodnja vakcina usmerena na HA podtipove virusa. Titar antitela na HA protein se određuje HI testom. HI test je specifičan test kojim se određuje mogućnost seruma da spreči hemaglutinaciju. Protein neuraminidaza takođe dovodi do stvaranja neutrališućih antitela kod pilića, ali se smatra da je njihova važnost manja od antitela stvorenih na HA protein.

Mukozni imunitet i produkcija sekretornih antitela igraju bitnu ulogu u procesu oporavka inficiranih ptica i obezbeđuju zaštitu za druge infekcije, naročito za LPAI infekcije koje su primarno mukozne. Mukozni imuni odgovor takođe igra bitnu ulogu u zaštiti od HPAI infekcija, s obzirom na to da je inicijalno izlaganje virusu kod ovih infekcija preko mukoze. U literaturi postoji malo podataka o ulozi mukoznog imuniteta kod pilića i ćuraka inficiranih virusom influence.

Celularni imuni odgovor je veoma bitan mehanizam odbrane protiv većine virusnih agenasa. Mnoga pitanja vezana za ulogu celularnog imuniteta kod ptica inficiranih virusom influence i dalje su neistražena i neispitana. Makrofagi se smatraju prvom linijom odbrane protiv infektivnih agenasa. Aktivirani makrofagi imaju ključnu ulogu u nespecifičnom i specifičnom imunom odgovoru i smatraju se značajnim medijatorom inflamacije. Uloga makrofaga u patogenezi influenza A virusa je dobro proučena kod sisara (Peschke i sar., 1993). Humani i mišji makrofagi olakšavaju replikaciju virusa influence, pri čemu dolazi do ćelijske smrti makrofaga. Avijarna ćelijska linija makrofaga HD11 olakšava replikaciju subtipova virusa influence podtipa HA 13 (Lyon i Hinshaw, 1991). Uloga makrofaga u imunom odgovoru je u produkciji citokina kao i fagocitozi stranih partikula. Fagocitozna uloga makrofaga je bitna zbog uklanjanja stranih partikula kao što su apoptične i nekrotične ćelije. Tokom procesa fagocitoze, makrofage podležu respiratornom prasku pri čemu dolazi do produkcije slobodnih kiseoničnih radikala i reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). Reaktivne vrste kiseonika imaju bitnu mikrobiocidnu ulogu i mogu dovesti do obimnih oštećenja tkiva u toku inflamacije. Infekcija makrofaga sisara virusom influence A rezultira smanjenjem respiratornog praska i dolazi do hemotaksičnog odgovora na egzogene agense (Abramson i sar., 1982). Ovim se objašnjava zašto su životinje inficirane virusom influence osetljivije na sekundarne bakterijske infekcije. Avijarne makrofage odgovaraju na virus influence na

sličan način. Lyon i Hinshaw su dokazali da dve ćelijske linije makrofaga inficirane različitim sojevima influenza A virusa produkuju manje azot-oksida, u poređenju sa neinficiranim kontrolnim ćelijama (Lyon i Hinshaw, 1993). Virus avijarne influence takođe dovodi do oštećenja funkcije makrofaga i u *in vivo* uslovima. Pulmonalne makrofage izolovane iz ćuraka inficiranih sojem A/Turkey/Minnesota/534/78 (H6N1) pokazuju smanjenu fagocitnu mikrobiocidalnu aktivnost 10 dana posle infekcije (Kodihalli i sar., 1994).

Tokom ranih faza inflamatornog odgovora, aktivirani makrofagi produkuju citokine. Citokini imaju značajne efekte tokom imunog odgovora kako na limfoidnu tako i na nelimfoidnu ćelijsku populaciju. U toku infekcije, ravnoteža između inflamatornih i anti-inflamatornih citokina je neophodna radi indukovanja odgovarajućeg imunog odgovora, oslobađanja od patogena i oporavka. Posebno bitni inflamatorni citokini su IL-1 $\beta$ , IL-6 i IFN- $\gamma$  zbog posredovanja u vaskularnoj permeabilnosti, ćelijskoj infiltraciji, nastanku bola, groznice, itd. Specifični citokini, poput interferona (IFN) mogu direktno da inhibiraju virusnu replikaciju. Visoke koncentracije citokina kao što su IL-6, IL-12, IL-18 i interferona tipa I dokazani su u plućima, slezini kao i krvnoj plazmi pilića inficiranih H5 HPAI virusima. Transformišući faktor rasta beta (TGF- $\beta$ ) pripada familiji malih polipeptida i predstavlja multifunkcionalni citokin koji ima ulogu u toku ćelijskih, fizioloških i imunoloških procesa. Sekretuju ga gotovo sve ćelije, uključujući i makrofage i visoko je konzerviran kod svih vrsta (Massagué i sar., 1992). U toku imunog odgovora, TGF- $\beta$  ima ulogu kao jak proinflamatorni molekul koji indukuje sekreciju citokina i stimuliše pomoćničke T limfocite. U istraživanjima Suarez i Schultz-a je dokazano da se kod pilića inficiranih Ty/Ont sojem virusa AI pojavljuje značajno povišenje serumske aktivnosti TGF- $\beta$ , 8 sati nakon infekcije i da ove vrednosti ostaju povišene do 48 časova. Aktivnost TGF-beta je takođe povišena i u plućima i slezini inficiranih pilića (Suarez i Schultz-Cherry, 2000).

## 2.8. DIJAGNOSTIKA BOLESTI

Dijagnostika influenza A virusa kod domaće živine i divljih ptica je teška usled varijacija u patogenosti virusa kod različitih vrsta ptica kao i usled antigenskih i genskih varijacija virusa. Izolacija virusa avijarne influence korišćenjem embrioniranih jaja je najosetljiviji i najpouzdaniji metod za detekciju infektivnog virusa. Međutim, ovaj metod nije pogodan prilikom dijagnostike kod velikog broja uzoraka. Sa druge strane, klasične laboratorijske metode kao što su agar-gel imunodifuzija, hemaglutinacija, inhibicija hemaglutinacije i virus neutralizacioni test su metode koje dugo traju i zahtevaju visok nivo biosigurnosti u laboratoriji. U novije vreme, ove metode su delimično potisnute i zamenjene metodama za direktnu detekciju genoma virusa avijarne influence. Nakon pojave velikih epizootija visoko patogene avijarne influence od 2003. godine, došlo je do značajnih poboljšanja u razvoju dijagnostičkih metoda za detekciju i praćenje virusa AI. Metode kao što su real-time PCR (real-time RT-PCR), izotermalna amplifikacija nukleinskih kiselina, nove generacije metoda za sekvenciranje (*eng.* Next Generation Sequencing-NGS) i imunohromatografija, predstavljaju brze, tačne i jednostavne metode za detekciju virusa avijarne influence. Zbog svojih velikih prednosti, preporuka je da se ove dijagnostičke metode kombinuju kako bi se tačnije i pouzdanije identifikovao uzročnik (Munster i sar., 2006; Stallknecht i sar., 2012; Yoshida i sar., 2011).

### **Izolacija virusa**

Izolacija virusa predstavlja „zlatni standard” za dijagnostiku virusa obzirom na visoku senzitivnost prilikom detekcije živih virusa. Za ovu metodu najpogodnije je od uginulih ptica uzorkovati sadržaj creva ili kloakalne i orofaringealne briseve, kao i uzorke pluća, creva, slezine, bubrega, mozga, srca – kao zasebne uzorke ili kao zbirne uzorke. Od živih ptica se uzorkuju orofaringealni i kloakalni brisevi. Metod se zasniva na inokulaciji obrađenog materijala uzorka u alantoinisku duplju embrioniranih SPF (*eng.* Specific Pathogen Free) ili SAN (*eng.* Specific Antibody Negative) jaja. Inkubacija se odvija na temperaturi od 37 °C u trajanju od dva do sedam dana. Definitivno prisustvo virusa

influenca potvrđuje se iz alantoinne tečnosti, primenom nekih od skrining testova kao što su test hemaglutinacije (HA), agar-gel imunodifuzija (AGID), ELISA, inhibicija hemaglutinacije (HI), inhibicija neuraminidaze (NI test) ili primenom molekularnih metoda kao što je reakcija reverzne transkripcije sa lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Najveća mana ove metode jeste što je dugotrajna i zahteva više vremena u odnosu na druge laboratorijske metode. Takođe, za izvođenje ove metode neophodno je posedovati embrionirana jaja (ili kulture ćelija), kao i laboratorije sa višim nivoom biosigurnosti.

### **Utvrđivanje indeksa patogenosti na pilićima**

Visoko patogeni virusi avijarne influenza se definišu kao virusi koji dovode do visokog mortaliteta kod pilića nakon intravenozne inokulacije. Prema uputstvu OIE-a, postoje dva kriterijuma za klasifikaciju HPAI virusa: prema prvoj podeli, HPAI virusima se smatraju oni koji dovode do uginuća više od 6 pilića starosti 4-8 nedelja nakon inokulacije 0,2 ml desetstrukog razređenja alantoinne tečnosti u kojoj je umnožen izolat virusa; prema drugoj podeli, HPAI virusima se smatraju oni koji imaju intravenozni patogeni indeks veći od 1.2. Ovi testovi su veoma pouzdani i jednostavni za identifikaciju HPAI virusa (Okamatsu i sar., 2016). Preporuka OIE-a u dijagnostici virusa influenza je takođe genetska analiza izolata kako bi se procenila patogenost virusa. Do danas, najzastupljeniji HPAI virusi pripadaju subtipovima H5 i H7. Patogenost ovih subtipova povezana je sa aminokiselinskom sekvencom na mestu cepanja HA i uključuje substituciju nebaznih aminokiselina sa baznim aminokiselinama (arginin ili lizin); inserciju višestrukih baznih aminokiselina kao i gubitak mesta glikolizacije na poziciji 13 molekula HA (Okamatsu i sar., 2016).

### **Dokazivanje antigena influenza A virusa**

Danas postoji nekoliko komercijalnih AC-ELISA (*eng.* Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testova kojima se može detektovati influenza A virus (Swayne i sar, 2013; Woolcock i Cardona, 2005). Većina kitova su imunoenzimski testovi ili se zasnivaju na imunohromatografiji (test lateralnog protoka) i koriste monoklonska

antitela protiv nukleoproteina virusa influence. Ovim testovima moguće je detektovati bilo koji influenza A virus. Glavna prednost ovih testova jeste brza dijagnostika, gde se virus influenza A može dokazati unutar 15 minuta. Glavni nedostaci ovih testova jesu nedostatak senzitivnosti, validacija testova nije izvršena za različite vrste ptica i ovim testovima nije moguće utvrditi identifikaciju subtipova virusa influence. Takođe, jedna od mana ovih testova je visoka cena. Iz tog razloga, ovi testovi su pogodni za brzu dijagnostiku bolesti na nivou jata (tzv. štalski testovi).

### **Dokazivanje virusne RNK**

Standardna lančana reakcija polimeraze PCR (*eng.* Polymerase Chain Reaction) je molekularna metoda koja se zasniva na amplifikaciji nukleinske kiseline uzročnika. S obzirom da je virus avijarne influence RNK virus, lančanoj reakciji polimeraze prethodi reverzna transkripcija radi dobijanja jednolančane (cDNA) koja ulazi u PCR reakciju, pa se stoga ova metoda naziva reverzna-transkripcija lančana reakcija polimeraze (RT-PCR). Uz primenu odgovarajućih prajmera, ova metoda omogućava brzu detekciju i subtipizaciju uzročnika iz kliničkih uzoraka. Međutim, molekularni metod za detekciju influenza A virusa koji se više preferira jeste real-time RT-PCR, koji predstavlja modifikaciju standardne RT-PCR metode. Prednost ovog metoda ogleda se u smanjenom vremenu za detekciju virusa, kao i vremena potrebnog za subtipizaciju i sekvenciranje. Metoda je pouzdana kao i izolacija virusa i predstavlja jeftiniju i mnogo bržu alternativu za dijagnostiku, gde se dijagnoza može dobiti za manje od 3 sata.

### **Imunohistohemija**

Imunohistohemija je efektivna metoda za detekciju virusa koja se zasniva na mogućnosti lokalizacije virusnog antigena u tkivnim isečcima (Nuovo, 2006). Ova metoda obezbeđuje kvalitativnu informaciju o intenzitetu infekcije. Imunohistohemijsko bojenje na parafinskim isečcima omogućava detekciju virusnih antigena u tkivima koja su fiksirana u parafinu, pri čemu su virusne čestice inaktivisane i na taj način je redukovana mogućnost izlaganja živom virusu. U toku procesa fiksacije tkiva u formalinu dolazi do otklanjanja lipidnog omotača virusa i narušavanja konformacije hemaglutinina usled čega dolazi do



inaktivacije virusa (King, 1991; Okamoto et al., 2004). Do danas, imunohistohemijsko bojenje je korišćeno za detekciju influenza virusa, korišćenjem specifičnih antitela na nukleoprotein i hemaglutinin virusa (Gao i sar., 1999; Gu i sar., 2007; Guarner i sar., 2006; To i sar., 2001). Rezultati imunohistohemijske metode se dobijaju u razumnom vremenskom roku, dok su troškovi opreme i potrošnog materijala relativno mali. Nukleoprotein influenza virusa je najviše konzerviran i obilno eksprimiran u odnosu na ostale proteine i iz tog razloga je najprikladniji dijagnostički target za antigensku detekciju (Nicholls i sar., 2012).

### **Serološka dijagnostika**

Svi influenza A virusi poseduju antigenski sličnu građu nukleokapsida i matriks antigena. Zahvaljujući toj činjenici, pomoću agar gel imunodifuzionog testa (AGID) moguće je detektovati prisustvo ili odsustvo antitela na bilo koji influenza A virus. Ovi testovi su se u velikoj meri upotrebljavali za detekciju specifičnih antitela kod pilića i ćuraka, međutim pokazali su se kao manje pouzdani prilikom detekcije antitela na AIV kod drugih vrsta ptica. AGID test spada u jeftine serološke skrining testove, međutim konačna dijagnoza se mora potvrditi primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI).

Danas se u savremenoj dijagnostici virusa influence koriste komercijalni ELISA kitovi kojima se mogu detektovati antitela na nukleoprotein virusa influence. ELISA testovi za ovu namenu su kompetitivna (AIV C-ELISA) i blokirajuća (AIV B-ELISA). Ovi testovi su se pokazali kao mnogo senzitivniji i pouzdaniji metod za detekciju antitela u odnosu na agar gel imunodifuzionu metodu (AGID).

### **Subtipizacija virusa HI i NI testom**

S obzirom da influenza A virus sadrži molekul hemaglutinina na površini virusne čestice, infektivne tečnosti poseduju hemaglutinacionu aktivnost. Test hemaglutinacije je brz i jednostavan i iz tog razloga je široko zastupljen kao skrining test za virus influence, kao i za detekciju virusa Newcastle bolesti. Eritrociti pilića se koriste za detekciju virusa avijarne influence, dok se eritrociti drugih vrsta (npr. ćuraka ili zamoraca) koriste za

detekciju humanih influenza virusa (WHO, 2002). Podtip hemaglutinina se određuje testom inhibicije hemaglutinacije (HI test). Vezivanje specifičnih antitela za antigenske receptore molekula hemaglutinina ometa vezivanje molekula HA i eritrocita, pri čemu je onemogućena hemaglutinacija. Princip metode se zasniva na mešanju standardizovane količine HA antigena sa serijskim razređenjima antiseruma i eritrocitima u mikrotitar pločama. Drugi bitan površinski glikoprotein virusa influence je neuraminidaza (NA), koja razdvaja terminalnu sijalnu kiselinu od sijaloglikana i ona je antigenski podeljena na 11 subtipova (NA1-NA11) korišćenjem testa inhibicije neuraminidaze (NI test). Za određivanje subtipova HA i NA, koristi se hiperimuni antiserum zbog antigenskih varijacija terenskih izolata virusa. Ovi testovi se rutinski primenjuju u referentnim laboratorijama za avijarnu influencu. Pileći serumi retko daju nespecifičnu pozitivnu reakciju aglutinacije u ovim testovima, premda je neophodno izvršiti predtretman seruma. Serumi poreklom od drugih vrsta koje nisu pileći mogu ponekad dovesti do nespecifične aglutinacije pilećih eritrocita (Okamoto i sar., 2016).

## **2.9. KONTROLA BOLESTI**

Za nisko patogene i visoko patogene sojeve avijarne influence, efektivni program kontrole ili eradikacije treba da sadrži sledeće elemente: integrisan nadzor i dijagnostiku na nacionalnom nivou; pojačane biosigurnosne mere na svim nivoima proizvodnje; edukaciju farmera i držaoca živine o kontroli bolesti; karantin i kontrolisan transport inficiranih jata; *stamping-out* živine inficirane visoko patogenim sojevima; i ređe, vakcinacija kao dodatna mera kontrole bolesti, koja se primenjuje pod strogim nadzorom države (Swayne i Suarez, 2000). Biosigurnost podrazumeva svaku fizičku barijeru ili radnu praksu koje se primenjuju sa ciljem preveniranja kontakta virusa sa osetljivim pticama, kao i sprečavanja širenja virusa od inficiranih ptica. Glavno pravilo je da se domaća živina drži odvojeno i bez ikakvog direktnog ili indirektnog kontakta sa divljim pticama. Jedan od načina kontrole mogućeg širenja virusa tokom transfera ptica u druge zemlje jeste stavljanje u karantin, gde

se u toku određenog vremenskog perioda vrši nadzor zdravstvenog statusa jata (Capua i Cattoli, 2013).

Dve glavne strategije koje se primenjuju u slučaju izbijanja avijarne influence jesu depopulacija i vakcinacija. Depopulacija je dosta skuplji ali svakako češći metod izbora u slučaju izbijanja visoko patogene avijarne influence na živinarskim farmama (Capua i Alexander, 2009). Sa druge strane, vakcinacija se češće primenjuje kao preventivna mera, što se pokazalo kao veoma efektivan metod u toku epizootije H5N1 (Ellis i sar., 2004b). Nekoliko zemalja, uključujući Kinu, Vijetnam, Pakistan, Indoneziju, Tajland i Egipat su sprovodile i još uvek sprovode skupi program vakcinacije živih ptica (Chen i sar., 2006; Webster i sar., 2006). Dva glavna izazova za kontrolu influence vakcinacijom jesu: 1. visoki troškovi prilikom izrade vakcine; 2. održati efektivnu vakcinu protiv brzo-mutirajućih virusa. Novije tehnike, kao što su reverzna genetika i himerni konstrukti se razvijaju sa ciljem proizvodnje jeftinijih vakcina, kao i viševalentnih vakcina protiv nekoliko patogena (Park i sar., 2006). Sa druge strane, veoma nepoželjan ishod vakcinacije može biti i enzootska transmisija i širenje virusa. U pojedinim slučajevima, korišćenje nestabilnih vakcina može dovesti do povećanja virulencije virusa (Iwami et al., 2009). Vakcinacija svakako jeste koristan metod u kontroli influence, ali velike nedostatke predstavljaju znantni finansijski troškovi, naročito ukoliko se vakcinacija primenjuje kod komercijalne živine koja je kratkog životnog veka. Takođe, vakcinacija sa sobom nosi dodatni rizik od daljeg širenja virusa. Za razliku od životinja, kod ljudi je vakcinacija glavna mera za kontrolu influence (Vandegrift i sar., 2010). Ukoliko se vakcinacija primenjuje kao jedan od mogućih metoda za kontrolu i suzbijanje bolesti, u obzir se moraju uzeti različiti varijabilni faktori koji utiču na efikasnost vakcinacije. U tom pogledu, postavlja se pitanje koliko često je potrebno vakcinisati jedinke i da li se vakcinacijom može dostići odgovarajući imunitet (Capua i Cattoli, 2013).

U skladu sa odredbama direktive (Council Directive 2005/94/EC) iz 2005. godine vakcinacija protiv avijarne influence je dozvoljena u zemljama Evropske Unije, kao dodatna mera za kontrolu bolesti. Strategija vakcinacije se mora sprovoditi zajedno u kombinaciji sa pojačanim biosigurnosnim merama (Dolka i sar., 2016). U Evropskoj Uniji, komercijalne inaktivisane vakcine su registrovane samo za piliće i pekinške patke, ali se

pokazalo da su efikasne i kod drugih vrsta ptica (Koch i sar., 2009; Lécu i sar., 2009). Mnoga istraživanja pokazuju da je vakcinalno indukovani imuni odgovor determinisan vrstom, tipom vakcine i primenjenom dozom (EFSA, 2007; Lécu i sar., 2009). Većina vakcina dostupnih na tržištu proizvodi se korišćenjem konvencionalnih tehnika, uključujući emulzifikaciju infektivne alantoijske tečnosti, inaktivirane beta-propiolaktinom ili formalinom (Spackman i Swayne, 2013).

## **2.10. AVIJARNA INFLUENCA KOD DOMAĆE ŽIVINE**

Galiformne vrste ptica, pre svega pilići i ćurke ne predstavljaju tipične domaćine za virus influence. Za ovu tvrdnju postoji nekoliko dokaza. U dve odvojene serološke studije rađene na divljim ćurkama, nije dokazano prisustvo virusa influence kod ove vrste ptica (Davidson i sar., 1988; Hopkins et al., 1990). Ovo ukazuje na to da u prirodi, ćurke nemaju ulogu u širenju virusa i ne predstavljaju prirodne domaćine. Ovakva istraživanja do sad nisu rađena na divljim kokoškama (*Gallus gallus*) ali je verovatno da kao i ostale galiformne vrste, ne igraju ključnu ulogu u ekologiji virusa influence. Jedan od bitnijih dokaza koji ukazuje da virus influence u normalnim uslovima ne inficira ove vrste jeste to što kod galiformnih vrsta ptica (pre svega pilića i kokošaka) virus influence pokazuje visoku stopu evolucije. Ovo je u suprotnosti sa niskom evolutivnom stopom virusa influence kod divljih ptica, kod kojih je virus visoko adaptiran (Suarez i Schultz-Cherry, 2000).

Uprkos činjenici da je populacija kokošaka i pilića najbrojnija kategorija domaće živine u celom svetu, u drugoj polovini 20. veka izveštaji o pojavi avijarne influence kod kokošaka bili su veoma retki u poređenju sa infekcijama kod ćuraka i pataka. Na primeru Sjedinjenih Američkih država, u periodu od 1964. do 1982. godine znatno su bile brojnije epizootije AI kod ćuraka, dok su samo tri epizootije kod kokošaka zabeležene u tom periodu (Alexander, 2000). Kokoške, ćurke i patke su vrste ptica koje su intenzivno izučavane u pogledu avijarne influence. Pojedina istraživanja su pokazala da su ćurke znatno osetljivije na LPAI infekcije u odnosu na kokoške (Pillai i sar., 2010; Spackman i

sar., 2010; Tumpey i sar., 2004). Pored toga, ćurke su veoma osjetljive i na HPAI infekcije, pri čemu su patogeneza, prenošenje virusa i patološki nalaz vrlo slični kao kod kokošaka (Perkins i Swayne, 2001; Perkins i Swayne, 2003). Eksperimentalna istraživanja na pilićima i ćurkama su pokazala da se LPAI virusi šire pretežno orofaringealnim putem i u nešto nižem procentu putem kloake (Spackman i sar., 2010; Swayne i Beck, 2005; Tumpey i sar., 2004). Slična dinamika prenošenja virusa odvija se i kod HPAI infekcija, ali u znatno višem procentu (Swayne i Beck, 2005). Period izlučivanja virusa kod galiformnih vrsta inficiranih HPAI virusima je kratak s obzirom da se uginuća javljaju nekoliko dana nakon inficiranja. Kod većine galiformnih vrsta, period izlučivanja virusa u proseku traje 1,5-4,5 dana, dok se prve virusne čestice počinjju izlučivati unutar 12-24 sata nakon inficiranja (Perkins i Swayne, 2001).

## **2.11. AVIJARNA INFLUENCA KOD DIVLJIH PTICA**

Divlje ptice preduzimaju dnevne ili sezonske migracije istražujući staništa pogodna za njihov opstanak i reprodukciju. Dnevne migracije podrazumevaju kraća pomeranja radi ishrane u okviru njihovog stalnog staništa, dok sezonske predstavljaju pomeranja na veće udaljenosti, koje mogu biti i interkontinentalne. Opisana kretanja iz jedne oblasti u drugu predstavljaju potencijalnu mogućnost da divlje ptice dođu u kontakt sa virusom AI a isto tako i mogućnost za širenje virusa u nova geografska područja (Boyce i sar., 2009).

Prvi zabeležen slučaj izolacije virusa avijarne influence kod divljih ptica bio je podtip H5N3, detektovan kod morske čigre (*Sterna hirundo*) u Južnoj Africi 1961. godine (Becker, 1966). Prilikom ove epizootije uginulo je oko 1300 ptica navedene vrste u Južnoj Africi (Olsen i sar., 2006). Do sredine sedamdesetih godina prošlog veka malo se znalo o ulozi divljih ptica u ekologiji avijarne influence, kao i o činjenici da divlje ptice predstavljaju veliki rezervoar influenza virusa. Do danas, virusi avijarne influence izolovani su u preko 105 različitih vrsta ptica iz 26 familija, što potvrđuje da su avijarni influenza virusi globalno distribuirani u okviru populacije slobodnoživećih divljih ptica. Virus AI su

izolovani kod ptica na svim kontinentima izuzev Antarktika, ali postoje dokazi o pozitivnom serološkom odgovoru kod ptica sa ovog kontinenta (Austin i Webster, 1993; Morgan i Westbury, 1981). Većina HA subtipova je izolovana kod ptica iz redova Anseriformes, dok su HA subtipovi H13 i H16 zastupljeni uglavnom kod ptica iz redova Charadriiformes (Munster i sar., 2007). Virusi avijarne influence su izolovani i kod ptica iz drugih redova (red Passeriformes, koji obuhvata više od polovine vrsta ptica). Malo je podataka o tome da li su određeni subtipovi ili sojevi virusa adaptirani na posebne vrste ptica, izuzev istraživanja koja su dokazala da su subtipovi H13 i H16 izolovani pretežno kod galebova. Razlike u vidu geografske lokalizacije, načina ishrane i migratornih ruta divljih ptica igraju bitnu ulogu u kompleksnoj ekobiologiji virusa avijarne influence (Taubenberger i Kash, 2010). LPAI virusi se mogu detektovati i kod velikog broja drugih divljih ptica koje nisu rezervoari virusa, ali još uvek se ne zna kod kojih su vrsta LPAI virusi endemski i koje vrste su prelazni domaćin za ove viruse (Munster i sar., 2007). Divlje vodene ptice, posebno one koje pripadaju redovima Anseriformes (patke, guske, labudovi) i Charadriiformes (galebovi i obalske ptice) smatraju se prirodnim domaćinom i rezervoarom nisko patogenih sojeva virusa avijarne influence (Alexander, 2000; Kawaoka i sar., 1988). LPAI virusi su visoko adaptirani na svoje domaćine, kod kojih dovode do asimptomatske infekcije. Replikacija LPAI virusa odvija se u epitelnim ćelijama intestinalnog sistema, dovodeći do oslobađanja velike količine infektivnih virusnih čestica putem fecesa u okolinu tokom dužeg vremenskog perioda. Kod divljih vodenih ptica primaran put transmisije LPAI virusa je fekalno-oralni (Alexander, 2000; Hinshaw i sar., 1979).

Za razliku od LPAI, HPAI virusi se normalno ne nalaze u divljim pticama, rezervoarima virusa LPAI. Nakon određenog perioda cirkulisanja virusa podtipova H5 i H7 u populaciji domaće živine, može doći do izbijanja HPAI infekcija i kod divljih ptica (Abdelwhab i sar., 2013; Capua i Marangon, 2000; Horimoto i sar., 1995). Za nastanak epizootija izazvanih HPAI virusima doprinose direktni kontakti divljih ptica sa domaćom živinom, kao i prodaja živine na otvorenom (Alexander, 2000). Od 2002. godine, javljaju se konstantne epizootije izazvane H5N1 podtipom AI kako kod domaće živine tako i kod različitih vrsta divljih ptica iz reda Anseriformes, u Aziji i Evropi. Na primer, procenjeno je da je epizootija ovim podtipom virusa AI u Kini tokom 2005. godine rezultirala globalnim

smanjenjem populacije indijske guske (*Anser indicus*) za 10% (Fouchier i sar.,2007). Najverovatniji način inficiranja divljih ptica HPAI H5N1 virusom odvija se inhalacijom infektivnog aerosola ili oralnim putem, u kontaktu sa kontaminiranom vodom (Reperant i sar., 2012). Takođe, kao jedan od puteva inficiranja ptica grabljivica virusom H5N1 navodi se konzumacija inficiranih leševa ptica (Van den Brand i sar., 2015). Tokom širenja enzootije AI H5N1 iz Azije u Evropu, dva događaja su ukazala da divlje ptice imaju ulogu kao virusni vektori na velikim udaljenostima (Gilbert i sar., 2006). Tokom epizootije 2005. godine, virus se brzo proširio zapadno od Rusije i Kazahstana prema Turskoj, Rumuniji i Ukrajini. Divlje ptice su predstavljene kao mogući vektori zbog činjenice da se virus pojavio na područjima u kojima ranije nije bilo detekcije virusa, a vreme izbijanja enzootije se podudaralo sa jesenjim migracijama divljih ptica između ovih područja. Sa druge strane, početkom 2006.godine virus H5N1 je detektovan kod mnogih divljih ptica vodenih staništa u Zapadnoj Evropi, u područjima u kojima nisu zabeležene epizootije u populaciji domaće živine (Keawcharoen i sar., 2008). Virus je detektovan kod određenog broja ptica iz reda Anseriformes uključujući labudove grbce (*Cygnus olor*), žutokljune labudove (*Cygnus cygnus*), krunaste patke (*Aythya fuligula*), i kanadske guske (*Branta canadensis*) (Brown i sar., 2008). Ove epizootije su se podudarile sa netipičnim migracijama divljih ptica, koje su nastale usled veoma hladnog vremena u području Crnog mora. Kvantitativna analiza globalnog širenja H5N1 infekcije takođe podržava teoriju o ulozi divljih migratornih ptica u širenju virusa influence (Kilpatrick i sar., 2006). Detaljnija istraživanja o ulozi određenih vrsta divljih pataka u širenju virusa H5N1 ukazala su na izvesne razlike među vrstama. Na primer, kod ćubastih pataka (*Aythya fuligula*) i glavatih pataka (*Aythya farina*) inficiranih HPAI H5N1 virusom utvrđeni su neurološki simptomi, dok su ovi klinički simptomi izostali kod patke gluvare (*Anas platyrhynchos*), male patke (*Anas crecca*), patke zviždarke (*Anas penelope*) i patke čegrтуše (*Anas strepera*) inficiranih istom dozom ovog virusa (Keawcharoen i sar., 2008). Pretpostavlja se da su patke gluvare najverovatniji vektor u prenošenju H5N1 virusa na velike udaljenosti, s obzirom da izlučuju velike količine virusa bez ispoljavanja kliničkih simptoma bolesti. Slično tome, visoka seroprevalenca specifičnih H5N8 antitela dokazana je kod pojedinih vrsta pataka, ukazujući na bitnu ulogu ovih vrsta u epidemiologiji HPAI H5 virusa (Jeong i sar., 2014). U odnosu na domaću živinu,

literaturni podaci o patologiji prirodne infekcije virusom influence kod divljih ptica su znatno oskudniji. Većina informacija dobijenih o patobiologiji HPAI infekcije kod divljih ptica dobijeno je u eksperimentalnim uslovima. Eksperimentalna istraživanja su rađena na galebovima (Perkins i Swayne, 2002), patkama (Brown i sar., 2006; Isoda i sar., 2006; Keawcharoen i sar., 2008; Kwon i sar., 2010), labudovima i guskama (Brown i sar., 2008; Kalthoff i sar., 2008; Neufeld i sar., 2009; Pasick i sar., 2007) i golubovima (Klopfleisch i sar., 2006; Perkins i Swayne, 2002).

Ispitivanja patobiologije prirodne infekcije HPAI virusima vršeno je na svrakama (Kwon i sar., 2005), vrapcima (Kou i sar., 2005), galebovima (Ellis i sar., 2004a), labudovima (Božić i sar., 2016; Kim i sar., 2015; Pálmai i sar., 2007; Teifke i sar., 2007; Vasković i sar., 2011), divljim guskama i patkama (Bröjer i sar., 2012), vranama (Tanimura i sar., 2006).

### **2.11.1. Avijarna influenza kod labudova**

Prvi zapis o osjetljivosti labudova na virus influence kao i njihova uloga u epidemiologiji avijarne influence potiču iz Japana (Otsuki i sar., 1982). Labudovi pripadaju porodici *Anatidae* i redu *Anseriformes* i kao i ostale ptice iz ovog reda smatraju se prirodnim, asimptomatskim rezervoarom LPAI virusa. Međutim, tokom velike epizootije virusa AI H5N1 labudovi su bili jedna od najosjetljivijih vrsta divljih ptica, naročito u Evropi (Feare, 2010; Nagy et al., 2007; Teifke i sar., 2007). Procenjeno je da su od ukupnog broja inficiranih divljih ptica u Evropi, oko 70% bili labudovi, a od toga su 90% činili labudovi grbci (*Cygnus olor*) (Hesterberg i sar., 2009). Takođe, eksperimentalne infekcije virusom HPAI H5N1 na labudovima grbcima dokazale su veliku osjetljivost ove vrste, kao i mogućnost izlučivanja virusa u visokim koncentracijama (Brown i sar., 2008). Detekcija obolelih ili uginulih labudova je olakšana pre svega što su jedna od najvećih vrsta vodenih ptica, kao i činjenica da se često mogu naći u blizini naseljenih mesta (Hesterberg i sar., 2009). U toku programa monitoringa avijarne influence u većini evropskih i azijskih zemalja, labudovi su se smatrali indikatorskom (sentinel) vrstom u epidemiologiji HPAI



H5N1 infekcija, i iz tog razloga predstavljaju veoma bitnu vrstu za proučavanje epidemiologije avijarne influence (Feare, 2010; Teifke i sar., 2007). Pojedini autori smatraju da labudovi nisu biološki vektori virusa influence već krajnji domaćini u transmisiji virusa (Nagy i sar., 2007). Istraživanja su pokazala da labudovi mogu biti vektori za H5N1 na kratkim distancama i da predstavljaju novog domaćina za virus avijarne influence.

Sa pojavom novog podtipa virusa avijarne influence H5N8 u Evropi, tokom 2016-2017. godine kod labudova grbca takođe je zabeležena značajna stopa mortaliteta i morbiditeta. Uginuća su zabeležena i kod drugih vrsta labudova, kao što je veliki labud (*Cygnus cygnus*) i neidentifikovanih vrsta labudova (Napp i sar., 2018). Od tri vrste labudova koje obitavaju na evropskom kontinentu (*Cygnus olor*, *Cygnus cygnus* i *Cygnus columbianus bewickii*), jedino su labudovi grbci pretežno stacionarne vrste. Primećeno je da su se tokom ovih epizootija uginuća kod labudova detektovala kasnije u odnosu na druge vrste divljih ptica, što ukazuje da se infekcija kod labudova odvijala sekundarno. Iako je tokom aktivnog nadzora na AI u Evropi kod velikog broja divljih ptica iz reda Anseriformes utvrđen pozitivan nalaz, uloga tih ptica u prenošenju virusa H5N8 još uvek nije u potpunosti jasna (Napp i sar., 2018).

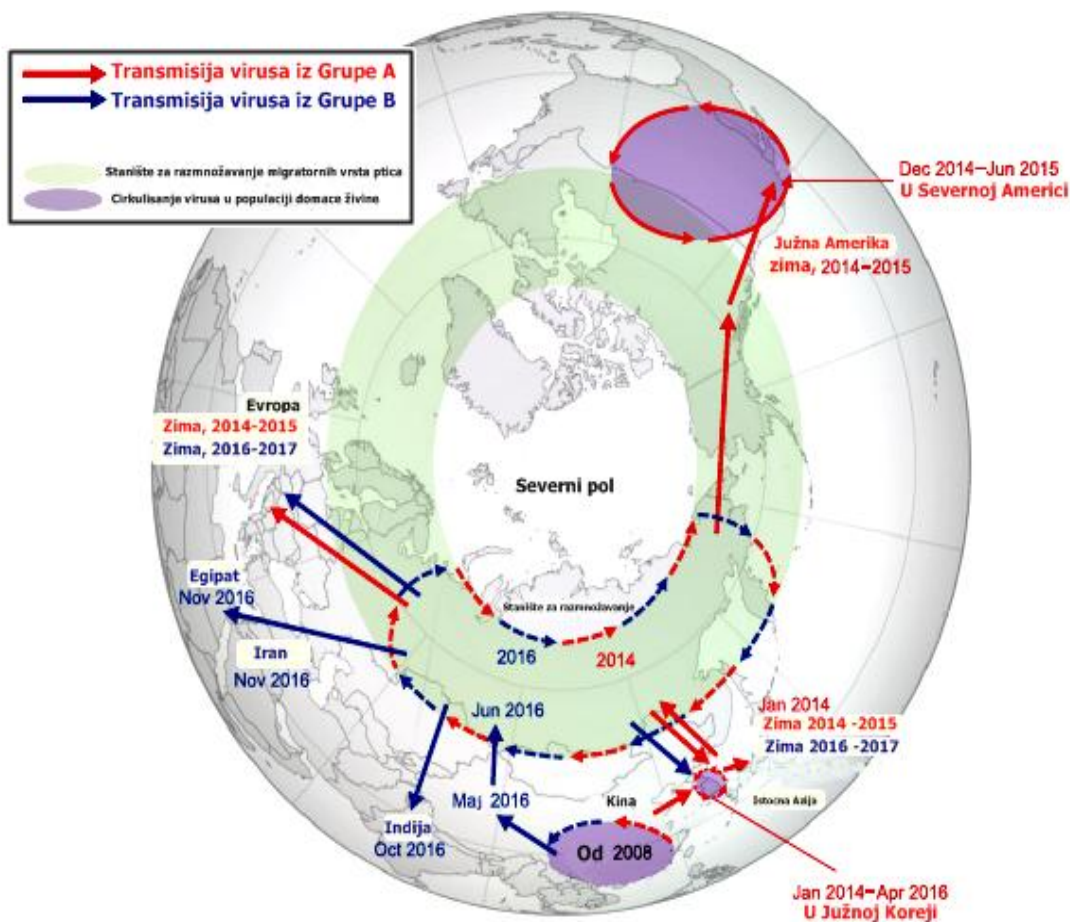
## **2.12. EPIZOOTIOLOGIJA VIRUSA AVIJARNE INFLUENCE PODTIPA H5N8 U SVETU**

Da bi se prikazala epizootiološka situacija vezana za visoko patogeni virus avijarne influence podtipa H5N8, neophodno je pre svega opisati genetiku i evoluciju ovog patogena. Virus HPAI podtipa H5N8 vodi poreklo od azijskog podtipa H5N1 (A/goose/Guangdong/1/1996 (Gs/GD/96)) koji je prvi put izolovan 1996. godine kod gusaka u Kini. Virus Gs/GD/96 je vremenom evoluirao u 10 genetski različitih filogenetskih klada (označene brojevima od 0-9). H5N1 virusi su podeljeni u 4 antigenske grupe, kojima pripadaju određene klade: grupa A (klade 1, 2.1, 2.4 i 8); grupa B (klade 1,

2.1, 4, 5, 7 i 9), grupa C (klade 2.1, 2.2 i 2.3) i grupa D (klade 2.3 i 5). Među njima, virusi iz klade 2.3.4 su konstantno cirkulisali u populaciji divljih vodenih ptica i živine, pri čemu su nastali novi podtipovi sa različitim NA genima, uključujući H5N2, H5N5, H5N6 i H5N8 (Napp i sar., 2018). Ovi HPAI podtipovi su vremenom evoluirani u nove, različite subklade, uključujući 2.3.4.4 (Lee i sar., 2017a).

Podtip virusa avijarne influence H5N8 koji pripada kladi 2.3.4.4 prvi put je detektovan kod domaće živine u Kini 2010. godine. Nakon toga, prva epizootija koja je prijavljena van granica Kine bila je u Koreji, u januaru 2014. godine (Lee i sar., 2014). Tokom ovih epizootija, u okviru klade 2.3.4.4 identifikovane su dve različite grupe AI H5N8 virusa - grupa A (Buan-like: A/Broiler-duck/Korea/Buan2/2014) i grupa B (Gochang-like: A/breederduck/Korea/Gochang1/2014) (Lee i sar., 2017b). Virusi iz grupe A su u septembru 2014. godine detektovani u istočnom delu Sibira, Istočnoj Aziji i Evropi kod različitih vrsta divljih ptica (Marchenko i sar., 2015), dok je prva detekcija virusa u severnoj Americi prijavljena krajem 2014. godine (Lee i sar., 2015). Rezultati filogenetskih analiza dokazali su da su virusi iz grupe A naknadno evoluirali u 3 različite podgrupe koje su bile rasprostranjene na različitim regionima: acA1 (Evropa/Istočna Azija), icA2 (Severna Amerika/ Istočna Azija) i icA3 (Istočna Azija) (Lee i sar., 2017a).

Virusi iz klade 2.3.4.4 grupe B se filogenetski razlikuju od virusa iz grupe A koji su cirkulisali u periodu 2014-2015. godine (Pohlmann i sar., 2017). U maju 2016. godine u Kini i u junu 2016. godine na Uvs-Nuur jezeru koje se nalazi na samoj granici Rusije i Mongolije, kod uginulih divljih ptica detektovan je novi, resortirani virus iz grupe B koji se sastojao od pet segmenata poreklom od evroazijskih LPAI sojeva virusa (PB2, PB1, PA, NP, i M) (Lee i sar., 2017b; Li i sar., 2017). Nakon tog slučaja, virusi iz grupe B su se iz Sibira proširili na različite geografski udaljene regione, uključujući Evropu, Aziju, Bliski Istok i Afriku. Diseminacija virusa iz grupe B tokom 2016. godine dovodi se u vezu sa jesenjim migracijama ptica na jug i slična je onoj koja je zapažena tokom širenja virusa grupe A iz Sibira prema evroazijskim zemljama (Marchenko i sar., 2015) (Slika 5).



**Slika 5.** Geografski prikaz globalnog širenja HPAI H5N8 virusa tokom 2014-2016. godine (prilagođeno prema Lee i sar., 2017a).

U Evropi, prvi slučaj AI H5N8 zabeležen je početkom novembra 2014. godine na farmi ćuraka u severnom delu Nemačke. Nekoliko dana kasnije, virus je detektovan na farmi koka nosilja u severnom delu Holandije i na farmi pataka u Jorkširu, Engleska. Obzirom da su se ove epizootije desile u kratkom vremenskom razmaku, na geografski udaljenim lokacijama i da su infekcijom zahvaćene različite vrste domaće živine, postavilo se pitanje koji je mogući način širenja i ulaska virusa na ove farme. Činjenica da su se ove epizootije desile u regionima koje naseljavaju brojne populacije divljih ptica i usled

nedostatka drugih epizootioloških dokaza, moglo se pretpostaviti da su različite vrste migratornih ptica doprinele širenju virusa u ove zemlje. Tokom aktivnog nadzora AI u Holandiji 2016-2017. godine, utvrđeno je da je najmanji procenat uginulih i H5N8 pozitivnih slučajeva bio kod pataka gluvara (*Anas platyrhynchos*). Ovi nalazi ukazuju na veliku otpornost ove vrste na HPAI H5N8 infekciju u odnosu na druge divlje ptice i može se pretpostaviti da imaju ulogu rezervoara virusa (Adlhoch i sar., 2018). Prema EFSA izveštaju iz 2014. godine, kao dva moguća načina unošenja virusa sa azijskog na evropski kontinent navode se unakrsne infekcije među različitim vrstama migratornih divljih ptica u severnom delu Evroazije, kao i uvoz žive živine i proizvoda od živine iz zaraženih područja sa azijskog kontinenta (EFSA, 2014). Takođe, kao jedan od razloga ekspanzije i održavanja virusa u Evropi tokom 2016-2017. godine navode se veoma niske temperature izmerene u periodu od oktobra 2016. do januara 2017. godine. U pojedinim delovima Rusije i istočne Evrope, izmerene temperature bile su i do 5 stepeni ispod proseka za to doba godine. Ovakvi vremenski uslovi su se povoljno odrazili na perzistiranje virusa u prirodi tokom dužeg vremenskog perioda. Pored toga, niske temperature su uticale na dodatna pomeranja ptica i njihovo skupljanje u veće grupe čime je bila olakšana diseminacija virusa influence među različitim vrstama (Napp i sar., 2018).

Od 2015. godine, a posebno tokom 2016. i početkom 2017. godine, epizootija virusa AI H5N8 zahvatila je celu severnu hemisferu. Područje Evrope je bilo zahvaćeno velikim brojem žarišta avijarne influence, posebno u drugoj polovini 2016. godine. Pored podtipa H5N8, istovremeno su cirkulisali i H5N9, H5N2, H7N7 i H5N5. Do avgusta 2017. godine na području 30 zemalja Evrope zabeleženo je 1112 žarišta AIV H5N8 u populaciji domaće živine i 955 žarišta među divljim pticama. Smatra se da je ovo do sada najveća zabeležena enzootija HPAI virusa na evropskom kontinentu. Najveći gubici u živinarskoj proizvodnji zabeleženi su u Francuskoj, gde je detektovano 420 žarišta i u Mađarskoj gde je prijavljeno 239 žarišta u populaciji domaće živine. Prema dosadašnjim podacima, najveći gubici su zabeleženi kod domaćih pataka (69%), kokošaka (12%), gusaka (10), ćurki (9%) i fazana (1%). Kada su u pitanju infekcije divljih ptica, najveći procenat žarišta zabeležen je u Nemačkoj (194), u Rumuniji (90) i u Švajcarskoj (87). Virus je detektovan kod različitih vrsta divljih ptica, pre svega kod vodenih ptica iz reda Anseriformes, ali i kod ptica

grabljivica koje se hrane leševima uginulih ptica (Adlhoch et al., 2016; Napp i sar., 2018). Do danas, u literaturi nije zabeležen ni jedan slučaj infekcije ljudi niti drugih vrsta sisara virusom AI podtipa H5N8. Međutim, veliki procenat genskih resotiranja među virusima iz grupe A može da predstavlja potencijalni rizik da vremenom virusi iz ove grupe izmene fenotipske karakteristike i postanu zoonotski agensi (Beerens et al., 2017; Brown et al., 2017).

### **2.12.1. Karakteristike epizootije avijarne influence podtipa H5N8 u Srbiji**

U našoj zemlji virus AI podtipa H5N8 prvi put je dijagnostikovao 29. novembra 2016. godine kod labudova grbca (*Cygnus olor*) sa lokaliteta specijalnog rezervata prirode “Koviljsko-Petrovaradinski” rit. Ovo prirodno dobro je plavno područje reke Dunav koje predstavlja kompleks barsko-močvarnih ekosistema i posebno je značajno zbog velikog broja i raznovrsnosti ornitofaune. Rit je takođe stanište velikog broja migratornih vrsta ptica i pretpostavlja se da su ove vrste doprinele širenju virusa iz susednih zemalja u kojima je virus AI H5N8 prethodno potvrđen.

Sa pojavom AI u Mađarskoj, blizu granice sa Srbijom, uspostavljena je ugrožena zona i pristupilo se sprovođenju pasivnog nadzora, a kasnije sa pojavom AI na području Srbije sprovodio se i aktivni nadzor na pojedinim područjima u Vojvodini. Aktivni nadzor je obuhvatao opservaciju divljih ptica u zaraženim i ugroženim zonama, klinički pregled živine i uzorkovanje materijala (kloakalni/trahealni brisevi) od domaće živine gajene u pomenutim zonama. Tokom epizootije AI H5N8 u našoj zemlji, koja je trajala nepuna 4 meseca (novembar 2016. – mart 2017.), prijavljeno je ukupno 24 žarišta i to na teritoriji Južnobačkog (11), Severnobačkog (1), Srednjebanatskog (3), Zapadnobačkog (1), Sremskog (2), Braničevskog (3), Borskog okruga (1) i grada Beograda (2) (slika 6).



**Slika 6.** Žarišta visoko patogene avijarne influenze podtipa H5N8 u Srbiji tokom 2016-2017. godine (preuzeto sa: <http://www.vet.minpolj.gov.rs/sr/avijarna-influenca>).

Većina registrovanih žarišta bila su na obalama reke Dunav i njenim rukavcima, kao i u neposrednoj blizini drugih reka, kanala, jezera i vodenih površina na severu zemlje. Najveći broj pozitivnih slučajeva na virus H5N8 potvrđen je kod labudova grpca (*Cygnus olor*) i pored toga virus je dijagnostikovao kod domaće živine u nekoliko manjih seoskih domaćinstava u Južnobačkom i Srednjobanatskom okrugu. Najveći stepen mortaliteta (preko 10%) u populaciji labudova grpca zabeležen je na teritoriji “Koviljsko-Petrovaradinskog rita”. Kao mera za sprečavanje širenja i iskorenjivanje bolesti, primenjena je preventivna mera depopulacije domaće živine u gazdinstvima koja su bila u direktnom ili bliskom kontaktu sa labudovima i ostalim divljim pticama sa lokaliteta Koviljskog rita.

Relativno kratak period epizootije virusa AI H5N8 u Srbiji delimično se može objasniti povećanjem temperature vodenih staništa i okoline koji negativno utiču na preživaljavanje virusa (Brown et al., 2007), kao i smanjenjem gustine populacije vodenih ptica u prolećnom periodu. U poređenju sa drugim evropskim zemljama u kojima je detektovan virus AI H5N8, epizootija u Srbiji je takođe pokazala ograničenu transmisiju virusa u populaciji divljih ptica.

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je uporedno ispitivanje i poređenje patobioloških karakteristika virusa avijarne influence podtipa H5N8 u uslovima prirodne infekcije kod labudova i kokošaka. Ovim bi se dobio detaljniji uvid u tropizam virusa u tkivima dve različite vrste ptica, kao i uloga pojedinih ćelija inflamacije u patogenezi bolesti. Pored toga, cilj istraživanja jeste identifikacija i molekularna karakterizacija virusa influence kao i utvrđivanje mesta izolovanog virusa na filogenetskom stablu, odnosno njegove pripadnosti određenom genotipu. Navedeni ciljevi su ostvareni kroz sledeće zadatke:

- Molekularno-genetička ispitivanja - dokazivanje prisustva virusa avijarne influence podtipa H5N8 primenom real time RT-PCR metode kod labudova i kokošaka uginulih tokom epizootije u Srbiji 2016-2017. godine;
- Filogenetska analiza identifikovanog virusa avijarne influence;
- Opis makroskopskih promena na različitim organima (mozak, pluća, srce, pankreas, bubreg, creva, slezina) labudova i kokošaka prirodno inficiranih virusom avijarne influence podtipa H5N8;
- Opis mikroskopskih promena na organima (mozak, pluća, srce, pankreas, bubreg, creva, slezina) labudova i kokošaka prirodno inficiranih virusom avijarne influence podtipa H5N8;
- Ispitivanje distribucije i ekspresije antigena virusa avijarne influence podtipa H5N8 u različitim organima (mozak, pluća, srce, pankreas, bubreg, creva, slezina) inficiranih labudova i kokošaka;
- Imunohistohemijsko utvrđivanje imunofenotipa i distribucije ćelija inflamacije (CD3, CD21) u tkivima - organima labudova i kokošaka prirodno inficiranih virusom avijarne influence H5N8;
- Imunohistohemijsko ispitivanje ekspresije glijalnog kiselog fibrilanog proteina (GFAP) u uzorcima mozga inficiranih ptica;
- Utvrđivanje statističke zavisnosti distribucije virusnog antigena i intenziteta patomorfoloških promena kod prirodno inficiranih labudova i kokošaka.

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. MATERIJAL**

#### **4.1.1 Ispitivani materijal**

Kao materijal za izradu ove doktorske disertacije korišćena su tkiva 15 odraslih labudova grbaca i 15 kokošaka uginulih tokom epizootije avijarne influence podtipa H5N8, tokom zime 2016-2017. godine. Uzorci uginulih labudova prikupljeni su u periodu novembar-januar, na teritoriji Južnobačkog okruga (lokalitet Specijalni rezervat prirode "Koviljsko-Petrovaradinski rit"), dok su uzorci uginulih kokošaka prikupljeni u februaru 2017. godine iz seoskog domaćinstva u naselju Botoš, u Srednjobanatskom okrugu. Ispitivani labudovi su opservirani nekoliko dana pre uginuća pri čemu su utvrđeni teški neurološki simptomi u vidu ataksije, vrtenja u krug i inkoordinacije. Bolest se kod obolelih kokošaka manifestovala u vidu ataksije, nakostrešenosti perja, opšte slabosti i depresije.

Ispitivane ptice su obdukovane na Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu. Nakon obdukcije i detaljnog makroskopskog pregleda organa, od svake ptice uzorkovani su mozak, pluća, srce, bubreg, slezina, creva i pankreas radi molekularnih, patohistoloških i imunohistohemijskih ispitivanja. Detekcija i potvrda virusa avijarne influence podtipa H5N8 iz organa uginulih ptica izvršena je na Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu, kao i u referentnoj laboratoriji za avijarnu influencu u veterinarsko-specijalističkom institutu u Kraljevu. Kao negativna kontrola korišćeni su organi labudova i kokošaka kod kojih metodom RT-PCR nije ustanovljeno prisustvo virusa avijarne influence.



## **4.2 METODE**

### **4.2.1. MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE I KARAKTERIZACIJE VIRUSA AVIJARNE INFLUENCE**

#### **4.2.2. Metoda reverzne transkripcije - lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real time RT-PCR)**

Utvrđivanje nukleinske kiseline genoma virusa avijarne influence (AI) vršeno je kroz više povezanih postupaka koji su obuhvatili:

1) izolaciju-ekstrakciju RNK iz uzoraka organa/tkiva ptica;

2) real-time RT-PCR (TaqMan reakcija) upotrebom komercijalnog kita "RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System", proizvođača „Invitrogen – Life Technologies“.

Prvi korak u utvrđivanju prisustva AI virusnog genoma predstavlja ekstrakcija ukupne RNK, odgovarajućeg kvaliteta i količine, iz ispitujućeg uzorka. Kao ispitujući uzorak korišćeni su organi i tkiva uginulih labudova i kokošaka (duodenum, pankreas, mozak i pluća).

#### **Postupak izolacije - ekstrakcije RNK**

Obrada uzoraka za ispitivanje vršena je na sledeći način: uzorci organa (duodenum, pankreas, mozak, pluća) dobro su usitnjeni makazama u tarioniku u količini od 1-2 g. Nakon toga dodat je kvarcni pesak i tučkom se vršila homogenizacija u tarioniku dok se nije dobila amorfnu kašu. Na ovako pripremljeno tkivo, dodato je 10 ml PBS-a (sterilnog fosfatnog pufera, pH 7,2) i vršeno je mešanje radi homogenizacije uzorka. Nakon ove primarne obrade, uzorci su pipetom i pipetom preneseni u kivete za centrifugu zapremine 15 mL i centrifugirani na 3000 obrtaja u minuti (rpm) u trajanju od 10 minuta radi taloženja krupnijih čestica homogenata.

Dobijeni supernatanti su u količini od 250  $\mu$ L preneseni pomoću mikropipete u mikrotube zapremine od 1,5 ml (PCR čiste - slobodne od enzima DNasa i RNasa), koristeći zasebne nastavke sa filterom. U mikrotube sa uzorcima je zatim zasebnim nastavcima sa filterom dodato po 750  $\mu$ L reagensa TRIzol® (proizvođača "Invitrogen life technologies"), uz mešanje. TRIzol® Reagent predstavlja monofaznu soluciju fenola i guanidin izotiocijanata koja je podesna za izolaciju RNK različitih vrsta (informaciona, transportna i ribozomalna) i molekularnih težina. Nakon toga vršena je inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Zatim je u svaku mikrotubu dodato po 200  $\mu$ L hloroforma koristeći zasebne nastavke sa filterom. Inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta nakon mešanja u vorteksu punom brzinom. U sledećoj fazi vršeno je centrifugiranje na 14000 rpm u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 4°C. Nakon toga, pažljivo je odpipetirana gornja vodena faza (koja sadrži RNK) u nove mikrotube zapremine od 1,5 ml, a ostatak materijala se odbacio zajedno sa korišćenim mikrotubama. Zasebnim nastavcima sa filterom na odlivenu vodenu fazu sa RNK dodato je 500  $\mu$ L izopropanola, inkubirano na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta i centrifugirano na 14000 rpm 10 minuta na 4°C radi taloženja RNK koja je pomoću isopropanola prešla u kristalnu formu. Nastali supernatant je pažljivo odbačen odlivanjem, a RNK sa dna mikrotuba je resuspendovana sa 500  $\mu$ L ledenog 75% etanola (-20°C). Zatim je vršeno mešanje vorteksom punom brzinom 15 sekundi i centrifugiranje na 10000 rpm 5 minuta na 4°C – tzv. prečišćavanje ekstrahovane RNK. U sledećoj fazi je vršeno odlivanje supernatanta u potpunosti i sušenje mikrotuba okretanjem na papirnu vatu. Osušena RNK u mikrotubama je nakon toga resuspendovana dodatkom ultračiste vode slobodne od enzima koji razlažu RNK i DNK (RNAza čista voda). Resuspendovani RNK uzorci su se nakon toga odmah koristili za metod real-time RT-PCR.

### **Izvođenje metode real-time RT-PCR**

Za dokazivanje prisustva genoma virusa avijarne influence primenjen je metod reverzne transkripcije - lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu i to TaqMan tip reakcije, koja se odvija u jednoj istoj tubi i u jednom, neprekinutom ciklusu (*eng.* „one-

tube“ ili „one-step real-time RT-PCR“). Reakcija je izvođena upotrebom komercijalnog kita RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System, po uputstvu proizvođača. «One-step» real-time RT-PCR-om se izolovana RNK putem enzima reverzne transkriptaze prevodi u jednolančanu DNK (cDNK) koja se u nastavku reakcije (real-time PCR, lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu) pomoću termostabilne DNK polimeraze umnožava do detektabilne količine (čak do  $10^6$  i više kopija). Pri tome, kompletna reakcija se odvijala u istom, jedinstvenom pufernom sistemu i izbalansiranim koncentracijama  $MgCl_2$  i dezoksi-nukleotidnih baza (dNTP). Princip reakcije se zasniva na temperaturnom režimu (koji se odvija u real-time PCR aparatu – „7500 Real Time PCR System“ – „Applied Biosystem“) diktiranom enzimskom umnožavanju specifičnog dela genoma virusa, definisanog primenjenim oligonukleotidnim prajmerima. U mešavini reakcije se osim oligonukleotidnih prajmera začetnika reakcije nalazi i oligonukleotidna „TaqMan“ proba, koja na svom 5' kraju ima vezan reporter energetskog signala, u ovom slučaju je to fluorofora 6-carboxyfluorescein (FAM), a na 3' kraju ima vezan ili tetramethylrhodamine - „TAMRA“ ili pak „black whole quencher – BHQ“ kao kvenčer („quencher“) koji upija / vezuje energiju reportera. U „neaktivnoj“ formi kada proba nije vezana za DNK lanac svu energiju koju emituje reporter upija kvenčer. Istovremeno sa stvaranjem lanaca specifičnog dela genoma koji određuju prajmeri tokom reakcije, vrši se vezivanje i uklapanje oligonukleotidne TaqMan probe na specifičnom delu lanca, u delu između vezivanja prajmera tj. tokom sinteze novog lanca. Tom prilikom se u TaqMan reakciji od probe odvajaju reporter energije (koji emituje signal koji detektuje real time PCR aparat) i kvenčer koji sa udaljavanjem od reportera ne može više da upija njegovu energiju i dolazi do emisije energije koju detektuje real-time PCR aparat. Količina emitovane energije je direktno proporcionalna količini tj. broju vezanih molekula TaqMan probe, odnosno broju novih sintetisanih lanaca.

Za detekciju virusa AI upotrebljena su tri seta prajmera i proba koji su preporučeni od međunarodnog biroa za kontrolu zaraznih bolesti životinja (OIE) („OIE Manual for terrestrial animals, Chapter 2.3.4.“), a dizajnirani su od strane Spackman i saradnika (Spackman i sar., 2002). Prvi set prajmera je specifičan za region u okviru konzervisanog matriks (M) gena svih influenza A virusa i prikazan je u Tabeli 4.

**Tabela 4 : Sekvence korišćenih prajmera i probe**

<b>Prajmer i probe</b>	<b>Sekvenca</b>	<b>Gen</b>
Forward M gene (SpaMgen F)	5'- AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG - 3'	M
Reverse M gene (SpaMgen R)	5' - TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG - 3'	
M gene probe (SpaMgen P)	5' - FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA - 3'	

Nakon dobijanja pozitivnog rezultata, odnosno nakon utvrđivanja prisustva genoma influenza A virusa u ispitivanim uzorcima, vršeno je tačnije određivanje, odnosno subtipizacija - da li detektovani virus influence pripada H5 ili H7 podtipovima. U tu svrhu je estrahovana RNK uključena u dve nove „one-step real-time RT-PCR“ reakcije u kojima su primenjena druga dva seta prajmera i proba za hemaglutinin gen za H5 i za H7 podtipove virusa AI. Set prajmera i TaqMan proba za H5 i H7 podtip (po „OIE Manual for terrestrial animals, Chapter 2.3.4.“ – dizajnirani od strane Spackman i sar. 2002) su prikazani u Tabelama 5 i 6. Ovim setovima prajmera i proba se potvrđuje ili isključuje prisustvo mogućih visoko virulentnih sojeva avijarne influence (HPAI).

**Tabela 5: Sekvence korišćenih prajmera i proba za H5 podtip**

<b>Prajmeri i proba</b>	<b>Sekvenca</b>	<b>Gen</b>
H5LH1 forward	5'- ACA TAT GAC TAC CCA CAR TAT TCA G -3'	HA
H5RH1 reverse	5'- AGA CCA GCT AYC ATG ATT GC -3'	
H5PRO proba	5'- FAM-TCW ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-TAMRA -3	

**Tabela 6: Sekvence korišćenih prajmera i proba za H7 podtip**

<b>Prajmeri i proba</b>	<b>Sekvenca</b>	<b>Gen</b>
LH6H7 forward	5'-GGC CAG TAT TAG AAA CAA CAC CTA TGA-3'	HA
RH4H7 reverse	5'-GCC CCG AAG CTA AAC CAA AGT AT-3'	
H7pro11 proba	5'-FAM-CCG CTG CTT AGT TTG ACT GGG TCA ATC T-BHQ-3'	

Ukratko, princip postavke za sve prethodno navedene reakcije je bio sledeći: svaka reakcija se sastojala od 15 µl reakcionog miksa koji je sadržao 1 x RNA UltraSense reakcionog miksa, 20 µM oba prajmera, 10 µM oligonukleotidne probe, 1 x ROX referentne boje i 1 µl od RNA UltraSense enzimskog miksa. Na ovu mešavinu je dodavana ekstrahovana RNK ispitujućeg ili kontrolnog uzorka u količini od 5 µl, što je činilo konačnu zapreminu reakcijske mešavine od 20 µl. Temperaturni ciklus reakcije je bio sledeći: reverzna transkripcija 15 min na 50°C, zatim 2 min na 95°C za DNK denaturaciju i inaktivaciju enzima reverzne transkriptaze, koja je praćena sa 50 uzastopnih ciklusa denaturacije od 15 sekundi na 95°C i vezivanja prajmera i proba sa izduživanjem nastalih lanaca DNK od 50 sekundi na 60°C. Reakcije TagMan RT-qPCR su izvedene upotrebom 7500 Real Time RT-PCR System instrumenta (Applied Biotechnology). Kontrola kvaliteta je pratila svaku reakciju. Kao pozitivne kontrole su u svakoj reakciji korišćeni referentni RNK virusi influence H3N8 podtipa Miami (A/equine/Miami/1/1963(H3N8)), H7N7 podtipa Prag (A/Equine/Prague/1/1956 H7N7) (NVSL, USA) i izolata virusa HPAI H5N1 1496/2006 (NIV-NS), a kao negativna kontrola je služila RNK/DNK čista voda.

Dodatno, nakon utvrđivanja H5 potipa virusa AI, kod pozitivnih uzoraka vršeno je specifično određivanje - subtipizacija gena za neuraminidazu (NA gena). Gen za neuraminidazu podtipa N8 je detektovan primenom konvencionalne, na gel detekciji bazirane, metode reverzne transkripcije - lančane reakcije polimeraze (RT-PCR), primenom QIAGEN OneStep RT-PCR kit” (“Qiagen”, Germany), kako je opisano od strane Fereidouni i saradnika (Fereidouni et al., 2009). Sekvence korišćenih prajmera za N8 prikazane su u tabeli 7.

**Tabela 7: Sekvence prajmera za NA8 gen**

<b>Prajmer</b>	<b>Sekvenca</b>	<b>Gen</b>
N8-F Forward	5'-GGTCAGGATAYAGYGGTTCYTTCAC-3'	NA
N8-F Reverse	5'-CCA CAC ATC ACA ATG GAG CT-3'	NA

Ukratko, postupak izvođenja reakcije je bio sledeći: reakcija je izvedena u ukupnom volumenu od 25  $\mu$ l i sastojala se od 12  $\mu$ l PCR čiste vode, 5  $\mu$ l 5x koncetrovanog pufera reakcije, 1  $\mu$ l dNTP miksa (koji sadrži 10 mM svakog dNTP-a), 1  $\mu$ l 20 M solucije svakog (oba) prajmera, 1  $\mu$ l RT-PCR miksa enzima i 5  $\mu$ l RNK uzorka. Kao pozitivna kontrola u svakoj reakciji korišćena je RNK virusa influence H3N8 soja Miami (A/equine/Miami/1/1963(H3N8)) (NVSL, USA), a kao negativna kontrola korišćena je RNK/DNK čista voda. Temperaturni protokol u aparatu "Mastercycler gradient" (Eppendorf, Nemačka) podrazumeva reverznu transkripciju na temperaturi od 50°C tokom 30 minuta, praćeno inicijalnom denaturacijom cDNK na 95°C tokom 2 minuta. Postupak PCR-a se sastojao od 40 ciklusa ponavljanja denaturacije na 94°C tokom 30 sekundi, vezivanja prajmera na 55°C tokom 30 sekundi i izduživanja sintetisanih lanaca DNK na 68°C tokom 60 sekundi. Finalno izduživanje lanaca DNK je bilo na 72°C tokom 10 minuta. Prisustvo specifičnog benda od 145 baznih parova je predstavljalo pozitivan nalaz na prisustvo genoma virusa N8 podtipa AI.

### **Interpretacija rezultata real time RT-PCR metode i konvencionalne RT-PCR metode**

U slučaju prisustva virusa AI u uzorku, prajmeri će se vezati za korespondentne delove na nukleotidnom lancu genoma virusa (forward prajmer sa 5' kraja, a reverse prajmer sa donje strane, odnosno 3' kraja dela cDNK genoma AI virusa koji se umnožava). Pri tome će se, u višestruko ponovljenim temperaturnim ciklusima denaturacije, vezivanja i izduživanja u real-time PCR aparatu, pomoću aktivnosti DNK polimeraze, ovaj deo genoma virusa eksponencijalno umnožiti u milionskom broju ugrađujući pri svakoj sintezi novog lanca TaqMan probu i emitujući energiju. Ukoliko je u uzorku bio prisutan genom AI virusa, tokom reakcije će se pojaviti pozitivni signal energije, koji će svakim narednim ciklusom logaritamski rasti, što će se detektovati/pojaviti na ekranu kao rastuća kriva.

U slučaju konvencionalne, na gel detekciji bazirane, RT-PCR metode prisustvo pozitivnog nalaza, odnosno umnoženog specifičnog dela genoma virusa avijarne influence se ogleda u nagomilavanju velike količine specifičnog produkta DNK određene veličine, tj. dužine koji se detektuje na agaroznom gelu. Veličina specifičnog produkta DNK virusa je

određena prajmerima i tačno je poznata. U slučaju detekcije N8 podtipa AI virusa metodom koja je primenjena u ovome radu, prisustvo specifičnog benda od 145 baznih parova je predstavljalo pozitivan nalaz na prisustvo genoma virusa AI podtipa N8.

#### **4.2.3. Metoda sekvenciranja izolata virusa avijarne influence**

PCR produkti izolata virusa avijarne influence su prečišćeni primenom QIA quick Purification Kita (Qiagen, Valencia, CA, USA). Prečišćeni PCR produkti su zatim sekvencionirani primenom Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), koristeći PCR prajmere kao prajmere za sekvenciranje. Sekvenciranje PCR proizvoda izvršeno je metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru. Protokol sekvenciranja se sastojao od inicijalne denaturacije na 96°C u trajanju od 2 minuta, praćeno sa 40 ciklusa ponavljanja – denaturacija na 96°C u trajanju od 10 sekundi, vezivanje prajmera na 50°C u trajanju od 5 sekundi i elongacije na 60°C u trajanju od 4 minuta. Sekvencionirani produkti su prečišćeni dodatkom izopropanola i denaturisani na 95°C u trajanju od 2 minuta. Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je softver ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Dobijene nukleotidne sekvence su upoređene sa odgovarajućim sekvencama virusa avijarne influence registrovanih u banci gena primenom BLAST softvera (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### **4.2.4. Izrada filogenetskog stabla**

Za formiranje filogenetskog stabla, korišćene su sekvence HA gena HPAI H5N8 sojeva prikazanih u tabeli 8.

**Tabela 8.** Spisak HPAI H5N8 sojeva čije su sekvence upotrebljene za formiranje filogenetskog stabla

DNA Sequences	Translated Protein Sequences	Group Name
1. KU201880	A/American wigeon/Washington/195198/2014 2014/12/16 4 (HA)	2.3.4.4a
2. KJ508932	A/Baikal teal/Korea/H41/2014 2014/01/19 4 (HA)	2.3.4.4a
3. KR233690	A/chicken/Netherlands/emc-3/2014 2014/11/21 4 (HA)	2.3.4.4a
4. KR232364	A/eurasian wigeon/Netherlands/1/2015 2015/02/25 4 (HA)	2.3.4.4a
5. KR233682	A/eurasian wigeon/Netherlands/2/2014 2014/11/24 4 (HA)	2.3.4.4a
6. 1007683	HA   A/Cygnus olor/Belgium/1567/2017   EPI_ISL_266538   MF073917   A / H5N8	2.3.4.4b
7. 1021148	HA   A/chicken/Czech Republic/3507-17/2017 (H5N8)   EPI_ISL_268992     A / H5N8	2.3.4.4b
8. 1023577	HA   A/Eurasian Wigeon/Netherlands/21/2016   EPI_ISL_269695     A / H5N8	2.3.4.4b
9. 1032492	HA   A/Goose/Hungary/17051/2017   EPI_ISL_271706     A / H5N8	2.3.4.4b
10. 1032524	HA   A/Mulard_duck/Hungary/60369/2016   EPI_ISL_271710     A / H5N8	2.3.4.4b
11. 1032532	HA   A/Mulard_duck/Hungary/62902/2016   EPI_ISL_271711     A / H5N8	2.3.4.4b
12. 1040225	HA   A/turkey/Italy/17VIR5878-3/2017   EPI_ISL_273847     A / H5N8	2.3.4.4b
13. 1044550	HA   A/mute swan/Kaliningrad/132/2017   EPI_ISL_274858     A / H5N8	2.3.4.4b
14. 1061371	HA   A/chicken/Belgium/5990/2017   EPI_ISL_278201   MF425637   A / H5N8	2.3.4.4b
15. 1081969	HA   A/goose/Italy/17VIR6358-3/2017   EPI_ISL_282143     A / H5N8	2.3.4.4b
16. 1087636	HA   A/chicken/Czech Republic/988-17/2017 (H5N8)   EPI_ISL_283129     A / H5N8	2.3.4.4b
17. 1104414	HA   A/Chicken/South_Africa/S2017/08_0561_P1/2017   EPI_ISL_285658     A / H5N8	2.3.4.4b
18. 1169201	HA   A/chicken/Rostov-on-Don/1598/2017   EPI_ISL_297235     A / H5N8	2.3.4.4b
19. 1169885	HA   A/chicken/Republic of Macedonia/466/2017   EPI_ISL_297388     A / H5N8	2.3.4.4b
20. 1176530	HA   A/peregrine falcon/Israel/1086/2016   EPI_ISL_298653   MF166577   A / H5N8	2.3.4.4b
21. 1186812	HA   A/chicken/Poland/117/2016   EPI_ISL_300978     A / H5N8	2.3.4.4b
22. 1223728	HA   A/mute swan/Croatia/85/2017   EPI_ISL_308777     A / H5N8	2.3.4.4b
23. 1223869	HA   A/Indian peafowl/Cameroon/17RS1661-6/2017   EPI_ISL_308808   MG650618   A / H5N8	2.3.4.4b
24. 1226460	HA   A/Buteo buteo/Belgium/3022/2017   EPI_ISL_309196   MH107223   A / H5N8	2.3.4.4b
25. 1226468	HA   A/Brahma chicken/Belgium/6153/2017   EPI_ISL_309197   MH107191   A / H5N8	2.3.4.4b
26. 1226469	HA   A/Guinea fowl/Belgium/6102/2017   EPI_ISL_309198   MH107199   A / H5N8	2.3.4.4b
27. 861568	HA   A/mute swan/Croatia/70/2016   EPI_ISL_238196     A / H5N8	2.3.4.4b
28. 869936	HA   A/chicken/Kalmykia/2661/2016   EPI_ISL_240109     A / H5N8	2.3.4.4b
29. 881901	HA   A/mute swan/Croatia/15/2017   EPI_ISL_241953     A / H5N8	2.3.4.4b
30. 922508	HA   A/chicken/Germany-NI/R11406/2016   EPI_ISL_249692     A / H5N8	2.3.4.4b
31. 925956	HA   A/domestic_duck/Siberia/49_feather/2016   EPI_ISL_250231     A / H5N8	2.3.4.4b
32. 954559	HA   A/swan/Italy/17VIR537-2/2017   EPI_ISL_255181     A / H5N8	2.3.4.4b
33. 954743	HA   A/Mute swan/Hungary/3542/2017   EPI_ISL_255204     A / H5N8	2.3.4.4b
34. 963516	HA   A/domestic duck/Germany-MV/R9764/2016   EPI_ISL_256818     A / H5N8	2.3.4.4b
35. AB593447	A/duck/Vietnam/G12/2008 2008/01/ 4 (HA)	2.3.4.3
36. AY676035	A/chicken/Korea/es/2003 2003// 4 (HA)	2.5
37. CY028961	A/silky chicken/Shantou/475/2004 2004// 4 (HA)	2.3.2
38. CY028969	A/duck/Hunan/533/2004 2004// 4 (HA)	2.3.1
39. CY028986	A/chicken/Yunnan/5686/2003 2003// 4 (HA)	2.4
40. CY034712	A/chicken/Laos/P0169/2007 2007// 4 (HA)	2.3.4
41. CY036253	A/magpie robin/Hong Kong/1097/2008 2008// 4 (HA)	2.3.2.1
42. CY041290	A/chicken/Egypt/0836/2008 2008/01/15 4 (HA)	2.2.1.1
43. CY063318	A/great crested-grebe/Qinghai/1/2009 2009/05/15 4 (HA)	2.3.2.1c
44. CY090124	A/chicken/India/81766/2008 2008/01/19 4 (HA)	2.2.2
45. CY126104	A/chicken/Sharkia/CAI3/2009 2009/09/01 4 (HA)	2.2.1.1a
46. GQ122384	A/chicken/West Java/UT1001/2003 2003/10/20 4 (HA)	2.1.1
47. GQ122395	A/chicken/Central Java/UT3091/2005 2005// 4 (HA)	2.1.3
48. GQ122403	A/chicken/East Java/UT6045/2007 2007/03/ 4 (HA)	2.1.3.3
49. GQ122555	A/chicken/East Java/UT6020/2006 2006/11/ 4 (HA)	2.1.3.3
50. GQ184246	A/chicken/Egypt/08124S-NLQP/2008 2008/01/10 4 (HA)	2.2.1
51. GU183461	A/chicken/Banten/Srg-Fadh/2008 2008/01/ 4 (HA)	2.1.3.2a
52. GU252822	A/duck/Tripura/103597/2008 2008/04/ 4 (HA)	2.2.2.1
53. HM172098	A/duck/Hunan/69/2004 2004// 4 (HA)	2.3.3
54. HM172454	A/bar-headed goose/Qinghai/3/2005 2005// 4 (HA)	2.2
55. JN588815	A/chicken/Cambodia/TKCMB5T/2010 2010/01/28 4 (HA)	1.1.2
56. JN646717	A/duck/Zhejiang/2244/2011 2011/02/ 4 (HA)	2.3.2.1b
57. JX420238	A/Muscovy duck/Ca Mau/1159/2006 2006/12/27 4 (HA)	1.1
58. A/mute swan/Serbia/1191/2017		2.3.4.4b



Molekularna i filogenetska analiza dobijenih nukleotidnih sekvenci izvršena je u programskom paketu MEGA verzija 6.0 (*eng.* Molecular Evolutionary Genetics Analysis) metodom “Maximum Composite Likelihood” i upotrebom “Neighbor-Joining” algoritma (Tamura et al., 2004, 2013). Za pouzdanost račvanja filogenetskog stabla, korišćena je metoda pseudoponavljjanja (*eng.* bootstrap) na osnovu 1000 ponavljanja.

#### **4.2.5. Priprema patohistoloških preparata**

Nakon izvršene obdukcije, sveža tkiva labudova i kokošaka (mozak, srce, pankreas, bubreg, creva, pluća i slezina) fiksirana su 48 sati u 10% neutralnom puferizovanom formalinu. Po završenoj fiksaciji izvršeno je modeliranje tkiva i uklapanje tkiva u parafin. Modelirano tkivo je prvo dehidrirano kroz seriju alkohola: 70%, 96% i apsolutni alkohol, a posle je prosvetljavano u ksilolu i impregnirano parafinom. Ceo proces posle modeliranja je obavljen u tkivnom procesoru za automatsko procesovanje tkiva “Leica TP 1020”. Prosvetljeno tkivo je uklopljeno u parafinske kalupe u parafinatoru “Leica EG1120”. Parafinski kalupi su sečeni na isečke debljine 4-5  $\mu\text{m}$  na mikrotomu “Leica RM 2235” i montirani na predmetna stakla za odgovarajuća bojenja. U svrhu imunohistohemijskog bojenja, parafinski isečci su montirani na predmetna stakla tipa “Superfrost”. Pre svakog bojenja montirani tkivni isečci na predmetnim staklima su bili 24 časa na 56°C u termostatu Binder E/B28. Zatim su tkivni isečci deparafinisani u ksilolu i rehidrirani kroz seriju alkohola (apsolutni alkohol, 96% i 70%), posle čega su bojani sledećim metodama bojenja: hematoksilin eozin i imunohistohemijskom metodom.

Priprema histoloških preparata, histohemijska i imunohistohemijska bojenja ispitivanih tkiva su obavljena na Katedri za patološku morfologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Analiza obojenih tkivnih isečaka je izvršena pomoću svetlosnog mikroskopa (Olympus, BX51).

#### **4.2.6. Hematoksilin-eozin bojenje**

Tkivni isečci ispitivanih ptica su bojeni standardnom metodom bojenja tkiva hematoksilin-eozin. Posle deparafinizacije i rehidriranja, tkivni isečci su bojeni u hematoksilinu (*eng.* Mayer's solution) u trajanju od 5 minuta. Diferenciranje je obavljeno u kiselom alkoholu, a bojenje u eozinu je trajalo 3 minuta. Nakon svake faze bojenja i diferenciranja, tkivni isečci su ispirani u vodi. Potom su dehidrirani kroz ascedentnu seriju alkohola i dovedeni do ksilola i na kraju su montirani medijumom za montiranje tkivnih isečaka.

#### **4.2.7. Imunohistohemijska metoda**

U svrhu imunohistohemijskog ispitivanja korišćen je komercijalni kit za bojenje Novolink™ Polymer Detection Systems Novocastra (Leica biosystems, Germany, Product No: RE7140-K). Od primarnih antitela korišćeni su: poliklonsko antitelo na nukleoprotein virusa avijarne influence (rabbit antinucleoprotein serum, Lab Dr. Jens P. Teifke, the Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany), monoklonsko antitelo za T limfocite (CD3), monoklonsko antitelo za B limfocite (CD21), monoklonsko antitelo za gljalni kiseli fibrilarni protein (GFAP).

U tkivnim isečcima je prvo izvršeno demaskiranje antigena korišćenjem citratnog pufera (pH 6,0), koji je zagrevan u mikrotalasnoj pećnici na 560W u trajanju od 21 minut. Aktivnost endogene peroksidaze je blokirana inkubacijom u Novocastra Peroxidase Block-u trajanju od 5 minuta. Nakon toga sledilo je ispiranje preparata fosfatnim puferom, dva puta po 5 minuta. Nespecifična mesta za vezivanje su blokirana proteinskim blokom (Novocastra Protein Block) u trajanju od 5 minuta. Nakon inkubacije sa proteinskim blokom, usledilo je ispiranje preparata fosfatnim puferom, dva puta po 5 minuta. Nakon inaktivacije endogene peroksidaze i demaskiranja antigena, preparati su inkubirani sa primarnim antitelima odgovarajućeg razređenja i pod određenim uslovima inkubacije (Tabela 9). Nakon inkubacije sa primarnim antitelom vršena je inkubacija sa post-primarnim antitelom (Post Primary) u trajanju od 30 minuta. Nakon ove inkubacije, preparati su ispirani dva puta po 5 minuta u fosfatnom puferu. U sledećoj fazi vršena je

inkubacija sa Novolink™ Polimerom u trajanju od 30 minuta. Ispiranje preparata 2 puta sa fosfatnim puferom u trajanju od 5 minuta vršeno je uz blago ljuljanje postolja na kojem su se nalazili preparati.

Za vizuelizaciju nastalog kompleksa antigen-antitelo korišćen je hromogen (diaminobenzidine tetrahydrochloride – DAB). Posle inkubacije sa hromogenom u trajanju od 5 minuta, preparati su ispirani destilovanom vodom, a zatim kontrastirani u hematoksilinu. Na mestu pozitivne reakcije javljao se precipitat smeđe boje. Nakon kontrastiranja, preparati su ispirani u vodi i na kraju montirani pomoću vodenog medijuma za montiranje Glycergel-a. Tokom imunohistohemijskog bojenja za sva ispiranja korišćen je fosfatni pufer PBS (*eng.* Phosphate buffer solution), čiji je pH bio u granici između 7,2 i 7,4. Kao negativna kontrola korišćeni su organi labudova i kokošaka kod kojih metodom RT-PCR nije ustanovljeno prisustvo virusa avijarne influence.

**Tabela 9.** Primarna antitela, razređenje primarnog antitela, uslovi inkubacije primarnog antitela i kit korišćeni za detekciju u imunohistohemijskom ispitivanju

Antitelo	Proizvođač	Razređenje	Inkubacija	Demaskiranje antigena	Kit za detekciju
Poliklonsko antitelo na nukleoprotein virusa influence	Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany	1:1000	60 minuta, sobna temperatura	citratni pufer pH=6 / 560 W / 21 minut	Novolink Polymer Detection Systems Novocastra
Anti Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	DAKO Z0334	1:400	60 minuta, sobna temperatura	Peroxidasa Block, 20 minuta. Proteinaza K, 6 minuta	Novolink Polymer Detection Systems Novocastra
Monoclonal rabbit-anti-human CD3	DAKO A0452	1:50	60 minuta, sobna temperatura	citratni pufer pH=6 / 560 W / 21 minut	Novolink Polymer Detection Systems Novocastra
Monoclonal Mouse Anti-Human CD21	DAKO IS608	Ready-to-use	60 minuta, sobna temperatura	citratni pufer pH=6 / 560 W / 21 minut	Novolink Polymer Detection Systems Novocastra

#### **4.2.8. Semikvantitativna analiza**

Semikvantitativnom analizom obuhvaćena je distribucija virusnog antigena u sledećim organima labudova i kokošaka: mozak, pankreas, pluća, srce, slezina, bubrezi i creva. Intenzitet imunohistohemijske reakcije je bodovan na sledeći način: negativna (-); slabo pozitivna (+), kada je uočena jedna pozitivna ćelija po vidnom polju na velikom uvećanju; umereno pozitivna (++) , kada je uočeno dve do pet pozitivnih ćelija po vidnom polju; i jako pozitivna (+++), kada je uočeno više od pet pozitivnih ćelija po vidnom polju na velikom uvećanju (400x).

#### **4.2.9. Metode statističke obrade podataka**

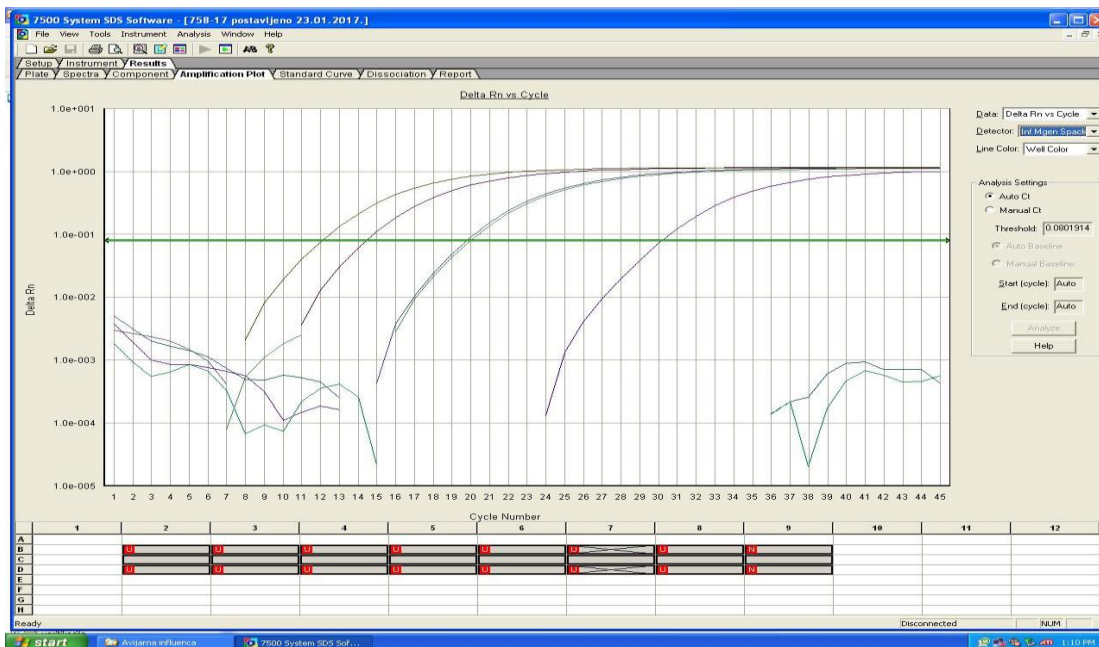
Za poređenje učestalosti makroskopskih, patohistoloških promena kao i zastupljenosti i ekspresije virusnog antigena u organima labudova i kokošaka korišćen je Hi kvadrat ( $\chi^2$ ) test ili Fisher exact test tačne verovatnoće.

## 5. REZULTATI

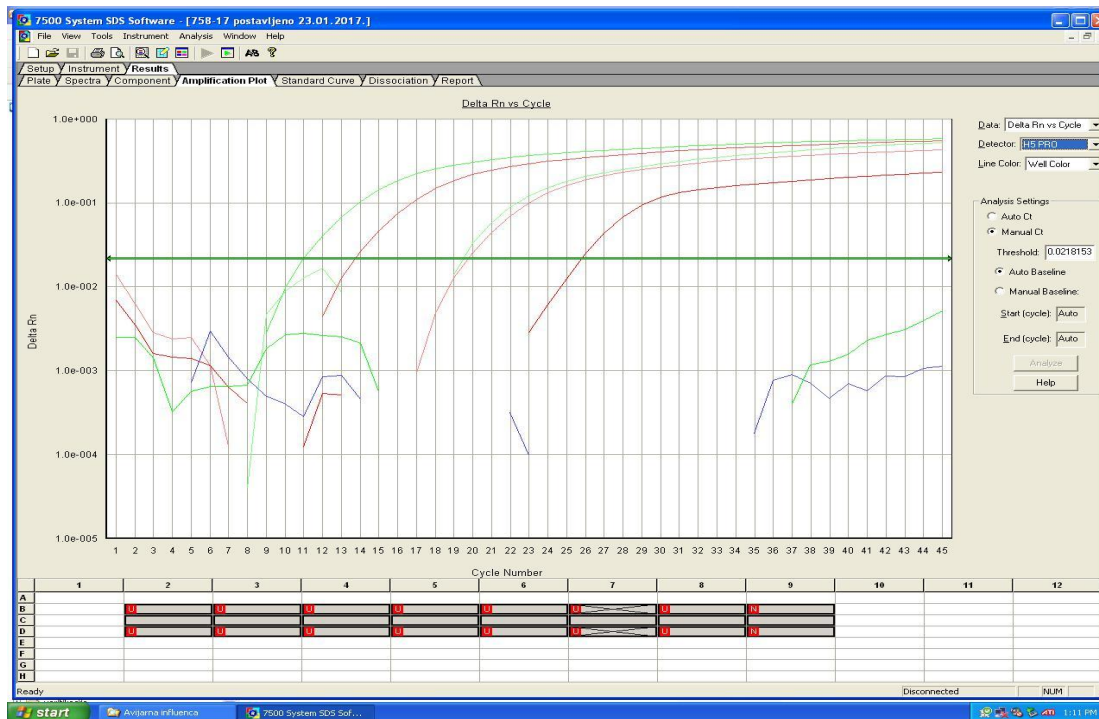
### 5. 1. Rezultati utvrđivanja genoma virusa avijarne influence primenom real time RT- PCR metode

Kod svih ispitivanih uzoraka labudova i kokošaka je metodom real-time RT-PCR utvrđeno prisustvo genoma virusa avijarne influence. Postojanje genoma virusa AI podtipa H5 u toku reakcije je detektovano kao pozitivni signal energije, koji je svakim narednim ciklusom logaritamski rastao i na ekranu se javila rastuća kriva. Rezultati real-time RT-PCR testa su automatski obrađeni kompjuterskim programom i prezentovani u vidu amplifikacionih kriva i graničnih (*eng.* treshold cycle) vrednosti.

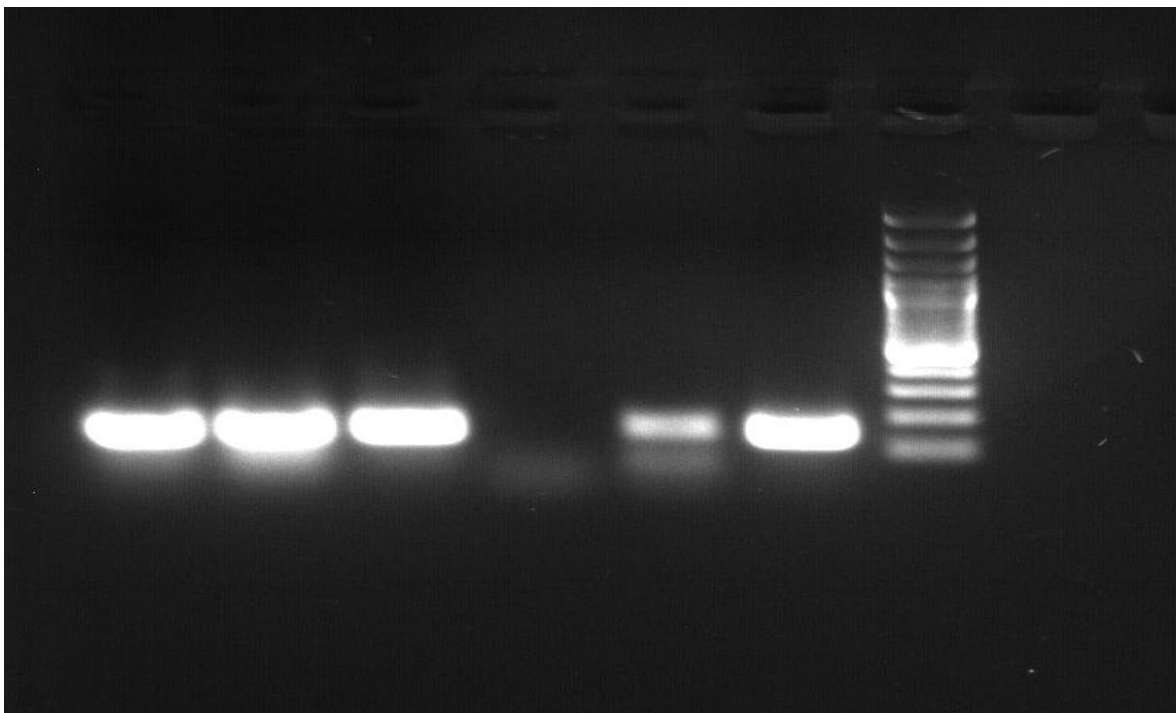
Rezultati prisustva M gena i H5 gena detektovanih influenza virusa metodom real time RT-PCR prikazani su na slikama 7 i 8. Metodom RT-PCR je utvrđeno prisustvo N8 gena virusa AI. U agaroznom gelu je kod svih uzoraka uočena traka, tj. „bend” umnoženih delova N gena, veličine 145 baznih parova, što je prikazano na slici 9.



Slika 7. Detekcija M (matriks) gena influenza virusa metodom real time RT-PCR



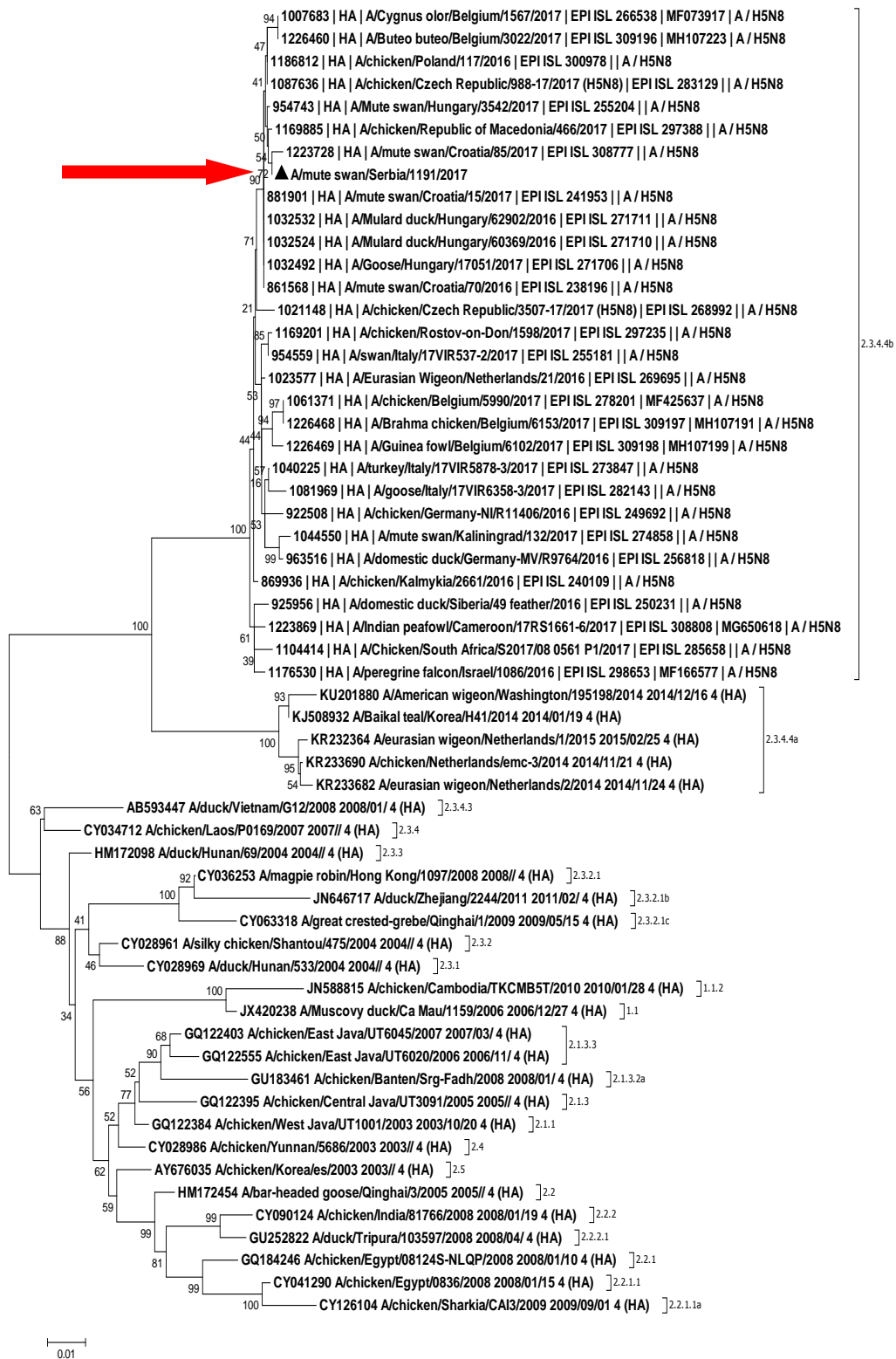
Slika 8. Detekcija H5 gena influenza virusa metodom real time RT-PCR



**Slika 9.** Vizuelizacija RT-PCR proizvoda elektroforeze. Sa leva na desno: od 1) do 3) N8 pozitivni uzorci, 4) negativna kontrola, 5) N8 slabo pozitivan uzorak, 6) pozitivna kontrola, 7) Marker od 100 baznih parova. Specifični bend od 145 baznih parova predstavlja pozitivan nalaz na prisustvo genoma virusa N8 podtipa AI.

## 5.2. Rezultati filogenetske analize

Upotrebom softverskog programa MEGA 6, uspešno je formirano filogenetsko stablo na osnovu HA sekvenci virusa AI izolovanog u Srbiji 2016-2017., kao i HA sekvenci sojeva virusa AI H5N8 registrovanih u banci gena (NCBI GenBank).. U izradi filogenetskog stabla korišćen je algoritam “Neighbor-Joining method”. Uvidom u filogenetsko stablo virusa AI H5N8 na osnovu sekvenci HA gena, detektovan podtip virusa AI H5N8 u Srbiji je pozicioniran u genogrubi – kladu 2.3.4.4 b. Utvrđeno je da je izolat virusa AI H5N8 detektovan u Srbiji najbližnji izolatima virusa iz Hrvatske, Mađarske i Makedonije.



Slika 10. Filogenetsko stablo virusa HPAI H5N8 (program MEGA 6).



### 5.3. Rezultati patomorfološkog ispitivanja kod labudova

#### 5.3.1. Makroskopski nalaz na organima labudova

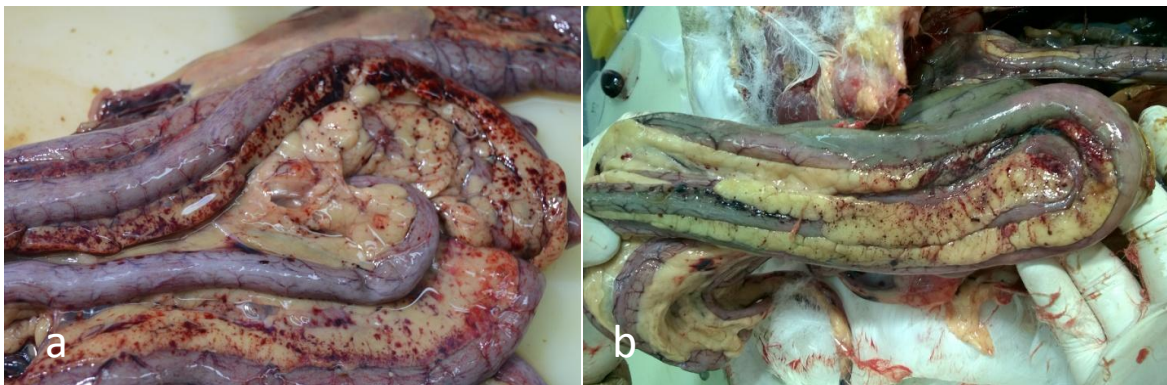
Ispitivanjem leševa uginulih labudova ustanovljena je dobra kondicija i uhranjenost. Kod većine labudova spoljašnjim pregledom leševa nisu uočene makroskopski vidljive promene. Kod tri labuda uočen je hemoragični sadržaj iz nozdrva (3/15), dok je hemoragičan sadržaj iz kloake bio prisutan kod dva labuda (2/15).

Makroskopski vidljive promene utvrđene su na sledećim organima: pankreas, srce, pluća, mozak, creva i slezina. Učestalost ustanovljenih makroskopskih promena prikazana je u tabeli 10. Bubrezi svih ispitanih labudova bili su bez vidljivih promena.

**Tabela 10:** Učestalost ustanovljenih makroskopskih promena u odabranim organima labudova.

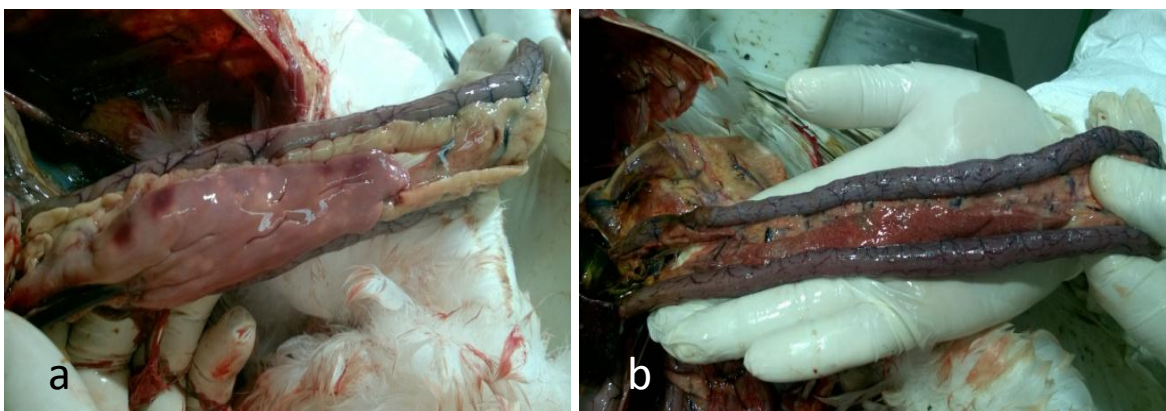
Organ	Tip promene	Učestalost promena (%)	
Mozak	Hiperemija	15/15	100%
	Edem	1/15	6.6%
	Krvavljenje	2/15	13.3%
Pankreas	Multifokalne nekroze	14/15	93.3%
	Petehijalna krvavljenja	7/15	46.6%
	Krvavljenje	6/15	40%
Bubreg	Krvavljenje	0/15	0
	Kongestija	0/15	0
Creva	Petehijalno krvavljenje na serozi	5/15	33.3%
	Hemoragičan sadržaj u lumenu	5/15	33.3%
	Hemoragije u mukozi	5/15	33.3%
Srce	Subepikardijalna krvavljenja	15/15	100%
	Prugasta krvavljenja u miokradu	8/15	53.3%
	Petehije u masnom tkivu epikarda	14/15	93.3%
Slezina	Kongestija	9/15	60%
	Nekroze	10/15	80%
	Splenomegalija	3/15	20%
Pluća	Kongestija	11/15	73.3%
	Krvavljenje	9/15	60%
	Edem	7/15	46.6%

Karakterističan nalaz, uočen kod svih ispitanih jedinki (15/15) bilo je tačkasto, difuzno rasuto krvavljenje na mezenterijalnom masnom tkivu (slika 11 a i b).



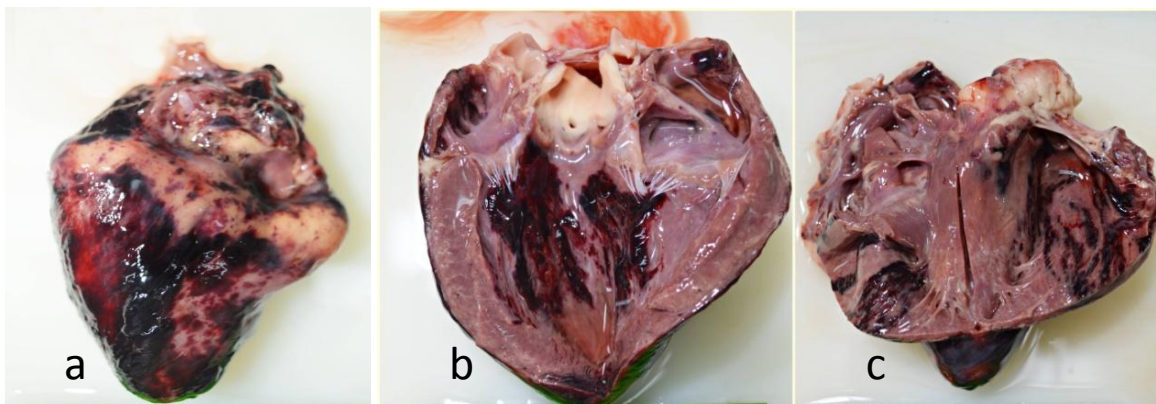
**Slika 11. a,b.** Makroskopski nalaz na mezenterijalnom masnom tkivu labudova - difuzno rasuta tačkasta krvavljenja.

Tkivo pankreasa je kod svih ispitanih labudova bilo zahvaćeno patološkim promenama. Kod svih ispitanih jedinki (15/15) uočila su se multifokalna nekrotična polja, okruglastog do eplipsastog oblika, belo-ružičaste boje, promera od 2-5 mm (slika 12a). Čest nalaz bila su tačkasta krvavljenja (slika 12b), koja su utvrđena kod 7 jedinki (7/15), kao i mrljasta krvavljenja (6/15) (slika 12a).



**Slika 12.** Makroskopski nalaz na pankreasu labudova. a) bela nekrotična polja okruglastog oblika i mrljasta krvavljenja. b) nekroze i tačkasta krvavljenja u pankreasu.

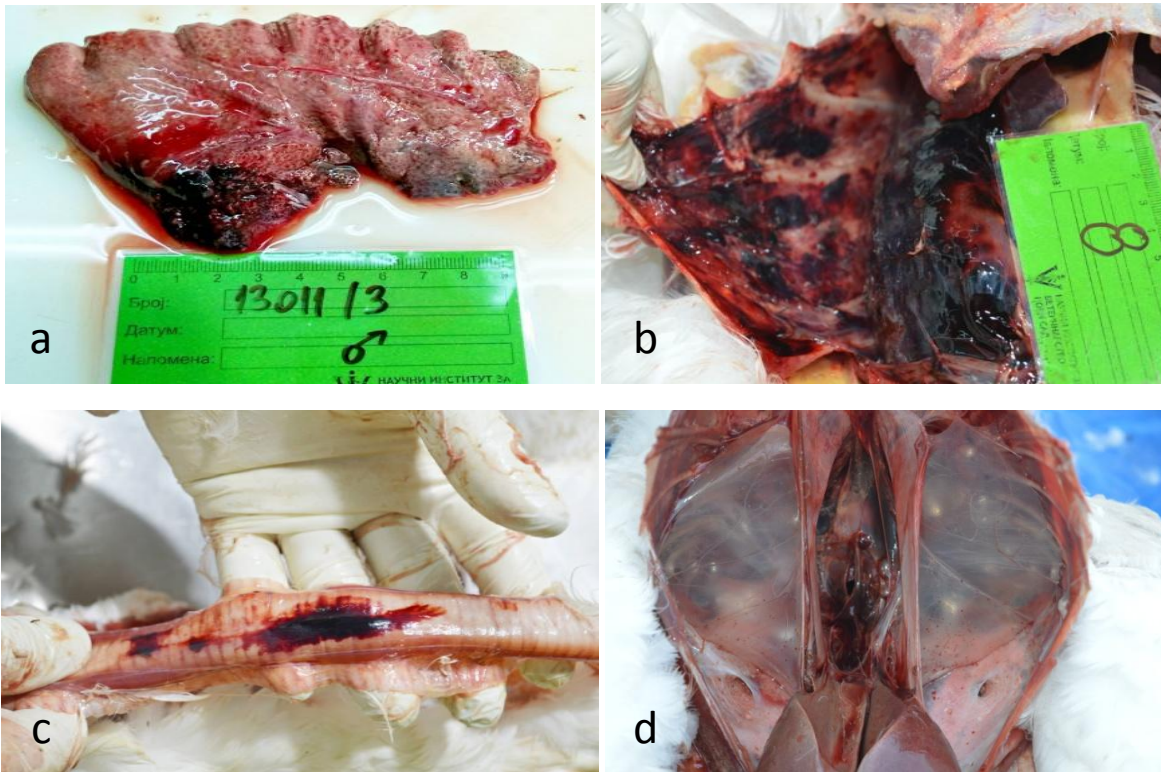
Promene na srcu bile su u vidu subepikardijalnih tačkastih i mrljastih krvavljenja, kod svih ispitanih jedinki (15/15) (slika 13a). Na endokardu su zapažena prugasta krvavljenja kod 8/15 labudova (slika 13b i c). Masno tkivo epikarda je takođe bilo zahvaćeno petehijalnim krvarenjima kod 14 ispitanih jedinki labudova (14/15).



**Slika 13:** Makroskopaki nalaz na srcu labudova. a) subepikardijalna krvavljenja. b) i c) Intramiokardijalne ehimoze.

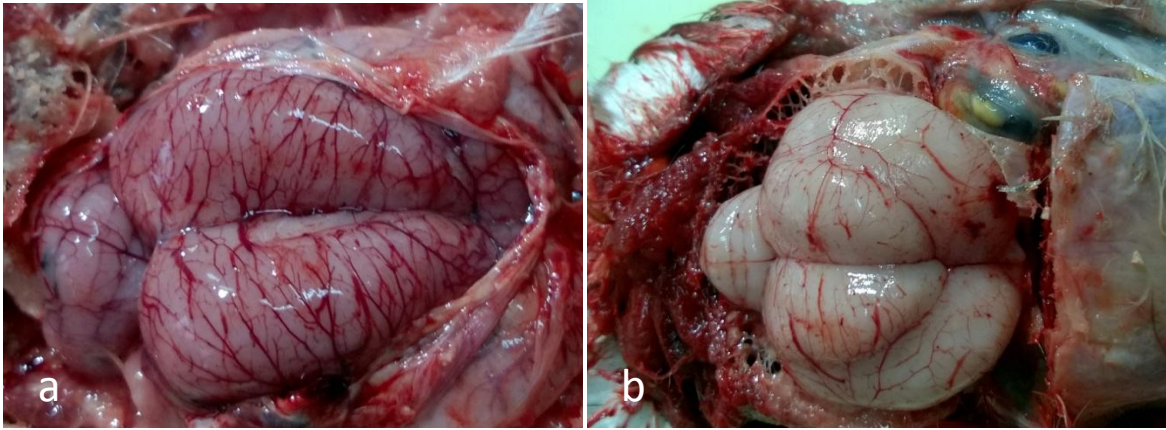
Pluća su kod većine ispitanih jedinki bila kongestirana, edematozna, sa izraženim krvavljenjima i zapaljenskim procesom, tamno-crvene boje (slika 15a). Kongestija je uočena kod jedanaest jedinki (11/15) dok je edem zapažen kod sedam jedinki (7/15). Krvavljenja su bila prisutna u devet slučajeva (9/15). Na preseku plućnog parenhima promjenjenih pluća uočavao se crveni, krvavo-penušavi sadržaj. Krvavljenja na pleuralarnoj serozi bila prisutna kod većine labudova (10/15) (slika 14b), dok su kod dva labuda uočena krvavljenja u mukozni traheje (slika 14c). Kod sedam labudova (7/15), na torakalnim vazдушnim kesama mogla su se uočiti petehijalna krvarenja kao i zadebljanje zida vazдушnih kes (slika 14d).





**Slika 14.** a) Makroskopski nalaz na plućima labudova: krvavljenja i kongestija plućnog parenhima. b) Krvavljenja u pleuralnoj serozi. c) Traheja labuda, krvavljenja u lumenu. d) Torakalne vazdušne kese labuda, tačkasta krvavljenja. Vazdušne kese su mutne, zadebljanih zidova.

Makroskopske promene na mozgu uočene su kod većine labudova. Promene su bile u vidu hiperemije i iniciranost krvnih sudova mozga, kao i hiperemija krvnih sudova moždanica (15/15) (slika 15a). Edem mozga uočen je kod jedne jedinke (slika 15b). Krvavljenje na moždanom tkivu zebeleženo je kod dve jedinke.



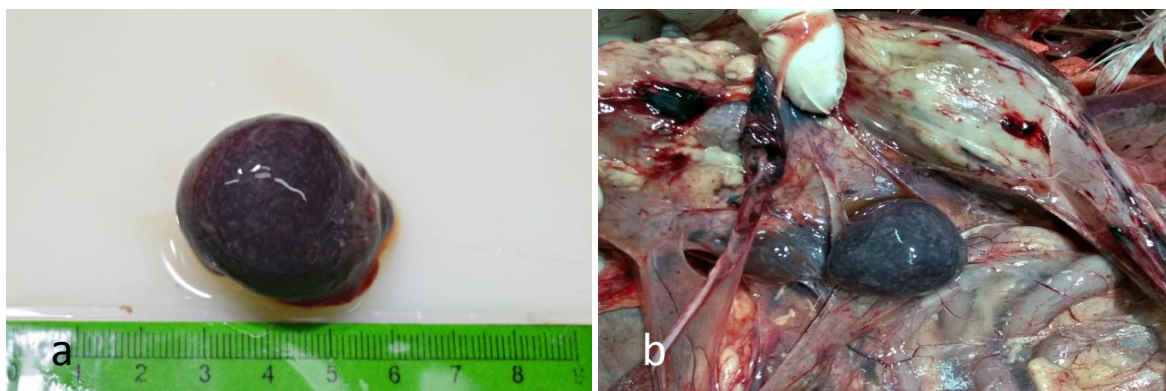
**Slika 15.** Makroskopski nalaz na mozgu labudova. a) hiperemija i iniciranost krvnih sudova; b) edem mozga labuda.

Makroskopskim pregledom creva utvrđena su petehijalna krvavljenja na serozi kod pet ispitananih jedinki (5/15) (slika 16a). Hemoragije u mukozi tankih creva sa zadebljenjem zida creva, kao i tečan sluzavo-hemoragičan sadržaj u lumenu creva mogao se uočiti kod pet jedinki (5/15) (slika 16b).



**Slika 16.** Makroskopski nalaz na tankim crevima labudova. a) petehije na serozi tankih creva b) sluzavo-hemoragičan sadržaj u lumenu tankih creva.

Makroskopske promene na slezini u vidu kongestije utvrđene su kod devet labudova (9/15), nalaz blelih tačkastih nekrotičnih polja uočen je kod deset jedinki (10/15) (slika 17a), dok je splenomegalija uočena kod tri jedinke (3/15) (slika 17b).



**Slika 17.** Makroskopski nalaz na slezini labudova: a) bleđa nekrotična polja b) splenomegalija.

### 5.3.2. Patohistološki nalaz na organima labudova

Patohistološkim ispitivanjem utvrđene su različite promene, različitog intenziteta u svim odabranim organima labudova. Tip patohistoloških lezija, kao i njihova učestalost prikazani su u tabeli 11.

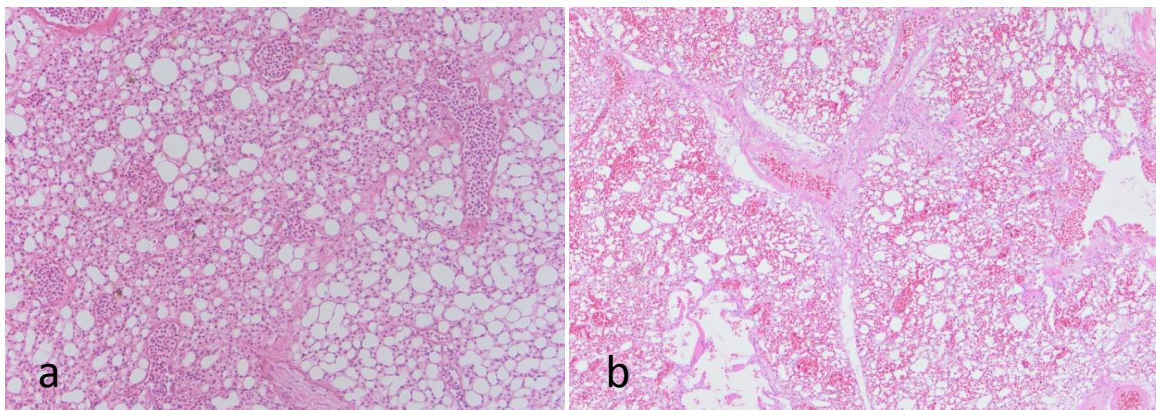
**Tabela 11:** Učestalost ustanovljenih patohistoloških lezija u organima labudova

Organ	Tip promene	Učestalost promena (%)	
Mozak	Neuronalna satelitoza	12/15	80%
	Neuronofagija	9/15	46.6%
	Limfocitni infiltrat	15/15	100%
	Encefalomalacija	2/15	13.3%
	Krvavljenje	9/15	60%
	Fokalne nekroze	6/15	40%
	Perivaskularno nakupljanje limfocita	12/15	80%
	Meningoencefalitis	12/15	80%
	Degeneracija neurona	7/15	46.6%
	Glioza	7/15	46.6%
Pankreas	Multifokalna nekroza sa infiltracijom mononuklearnih ćelija	15/15	100%
	Krvavljenje	6/15	40%
	Petehije	7/15	46.6%
	Vakuolizacija citoplazme	3/15	20%
Bubreg	Krvavljenja	4/15	26.6%
	Hiperemija	4/15	26.6%
	Tubulonekroze	7/15	46.6%
	Nakupine mononuklearnog infiltrata	4/15	26.6%
Creva	Kataralni enteritis	5/15	33.3%
	Limfocitni infiltrat	5/15	33.3%
Srce	Subepikardijalne petehije	15/15	100%
	Krvavljenja u miokardu	8/15	53.3%
	Limfocitni infiltrat u perimizijumu	5/15	33.3%
	Degeneracija kardiomiocita	2/15	13.3%
Slezina	Multifokalne nekroze limfatičnog tkiva u beloj pulpi	10/15	66.6%
	Krvavljenje	9/15	60%
	Hemosideroza	9/15	60%
	Hiperemija	5/15	33.3%
Pluća	Hiperemija	7/15	46.6%
	Krvavljenja	10/15	66.6%
	Kongestija	11/15	73.3%
	Edem	7/15	46.6%
	Intersticijalna pneumonija	1/15	6.6%



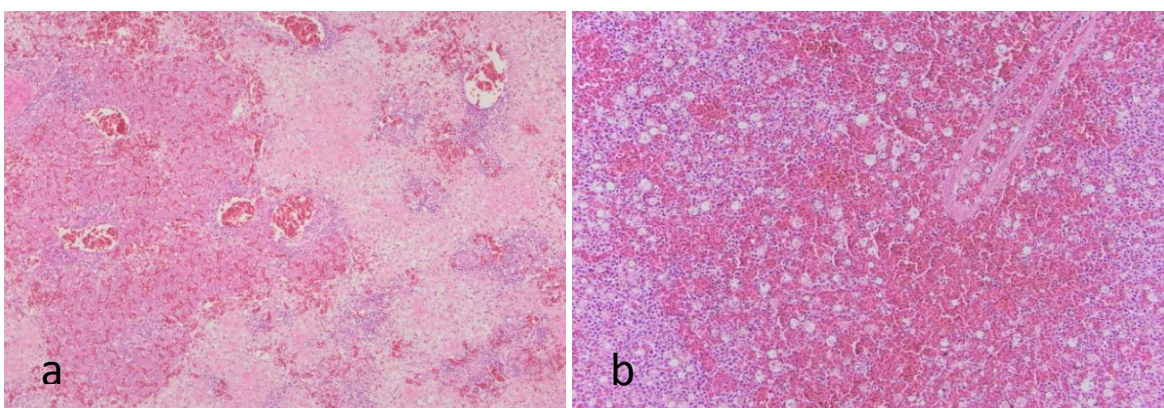
Histološkim ispitivanjem organa labudova ustanovljene su promene u plućima, srcu, slezini, bubrezima, pankreasu i mozgu kod većine ispitanih labudova.

Patohistološkim pregledom na plućima je ustanovljeno: hiperemija krvnih sudova (slika 18a), obimna krvavljenja (10/15) (slika 18b), kongestija (11/15), edem (7/15), dok je kod jednog labuda uočena intersticijalna pneumonija (1/15).



**Slika 18.** Pluća labuda: a) i b) masivna krvavljenja i hiperemija krvnih sudova, HE x 100.

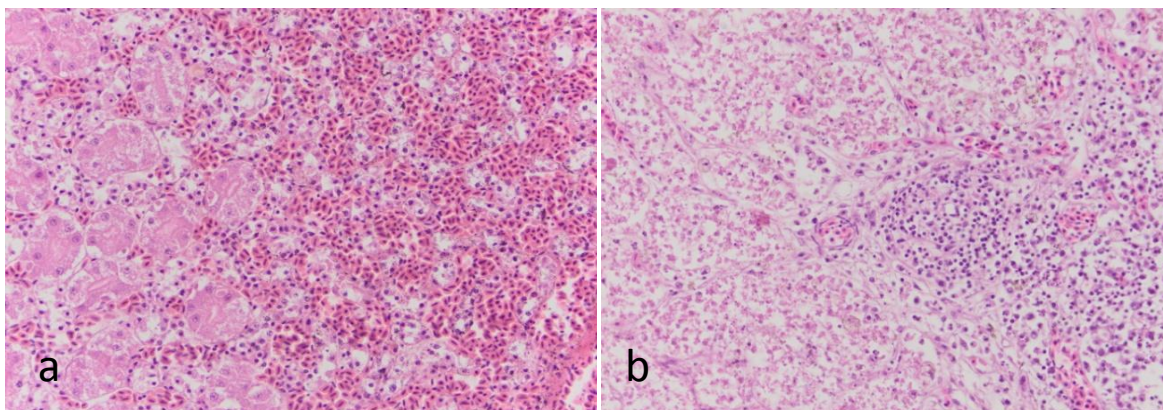
U slezini su utvrđene multifokalne nekroze limfatičnog tkiva u beloju pulpi (folikuli i PALS) (slika 19a), krvavljenje, hiperemija krvnih sudova kao i hemosideroza, nastala kao rezultat masivnih krvavljenja (slika 19b).



**Slika 19.** Slezina labudova: a) hemoragije i nekroza, HE x 100 b) hemoragije i hemosideroza, HE x 200.

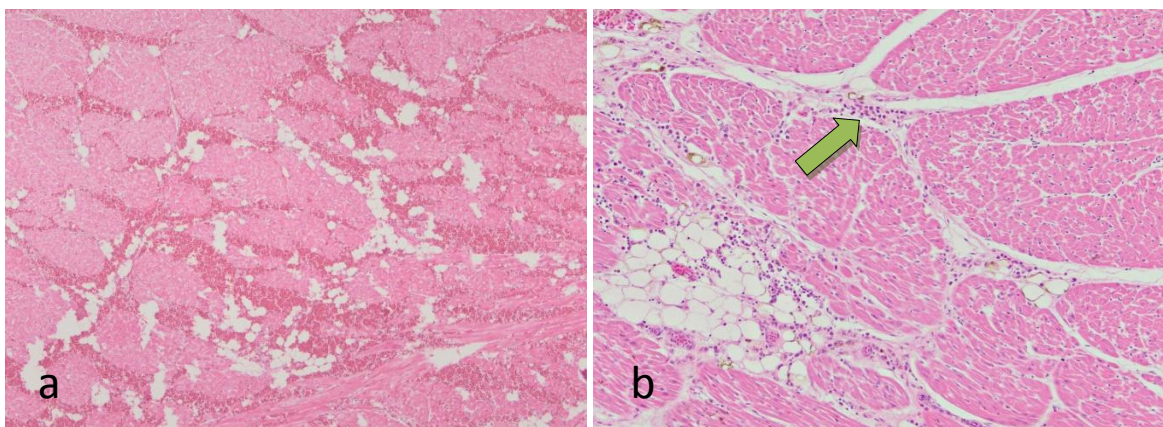


U bubrezima su kod četiri jedinke utvrđena obilna krvavljenja i hiperemija krvnih sudova, dok su u tubulocitima uočene nekroze (slika 20a). Kod trećine ispitanih jedinke zabeležen je mononuklearni ćelijski infiltrat sačinjen pretežno od limfocita i plazma ćelija (slika 20b).



**Slika 20.** Bubrež labudova. a) Hemoragije i tubulonekroze, HE x 400; b) Hemoragije i mononuklearni ćelijski infiltrat, HE x 400.

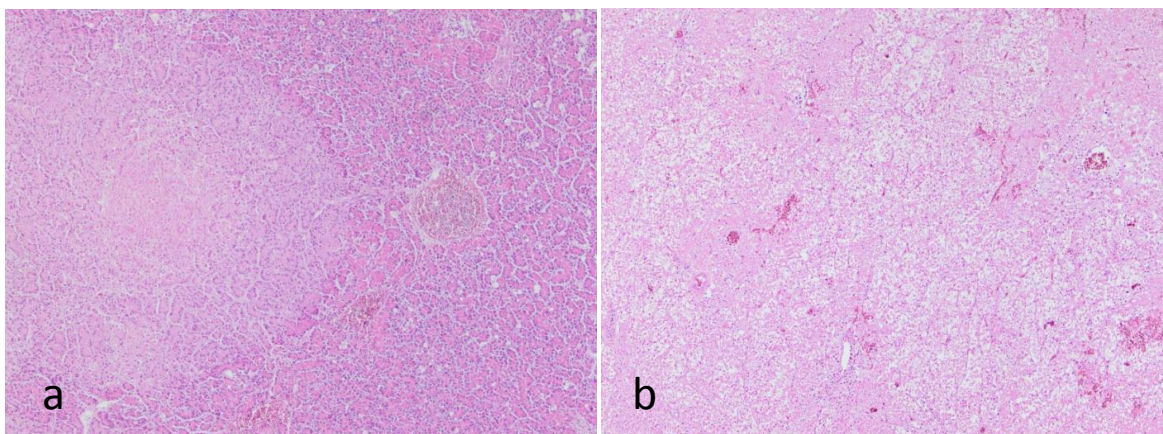
Patohistološke promene u srcu bile su u vidu petehijalnih krvavljenja subepikardijalno, dok su u miokardu uočena masivna krvavljenja (slika 21a). U nekoliko slučajeva uočen je limfocitni infiltrat u perimizijumu (slika 21b). Kod dve jedinke uočena je degeneracija kardiomiocita (2/15).



**Slika 21.** Srce labudova a) Hemoragije u miokardu, HE x 100; b) Limfocitni infiltrat u perimizijumu (strelica), HE x 200.

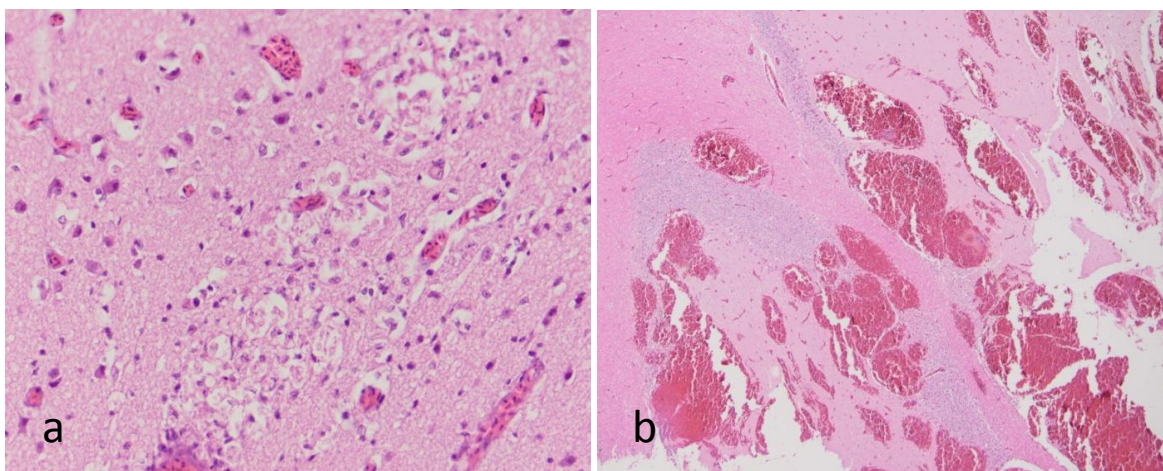


U pankreasu su uočena područja multifokalne nekroze, sa infiltracijom mononuklearnih ćelija (slika 22a). Tačkasta krvavljenja zapažena su kod 7 labudova (7/15), dok su mrljasta krvavljenja uočena kod 4 labuda (4/15) (slika 22b).



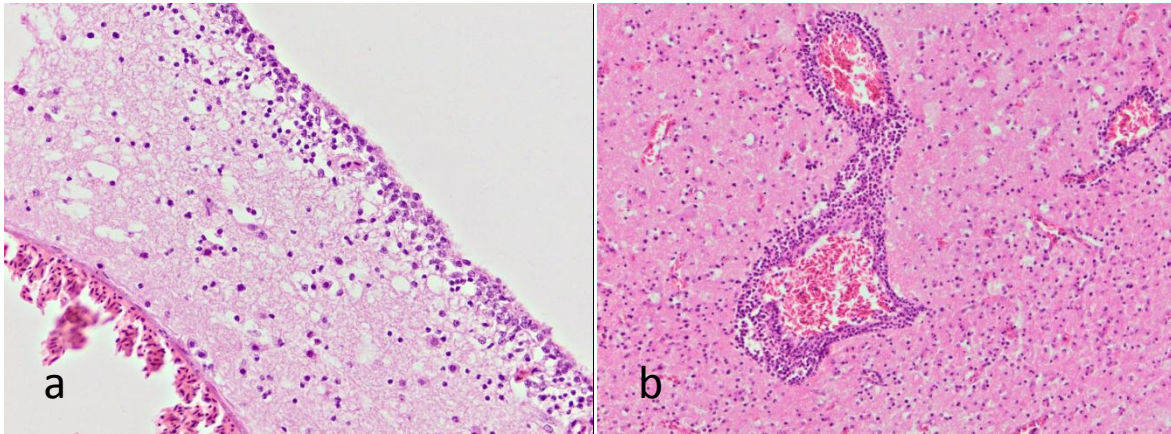
**Slika 22.** Pankreas labudova. a) Nekroza, HE x 100; b) krvavljenja i nekroze, HE x 100.

U mozgu su uočena neuronalna satelioza, neuronofagija - fagocitoza oštećenih neurona od strane aktiviranih mikroglia ćelija, nakupljanje limfocitnog infiltrata u velikom mozgu i degeneracija neurona. Kod dva labuda uočena je encefalomalacija (2/15) (slika 23a). U malom mozgu uočavaju se masivna krvavljenja i fokalne nekroze (slika 23b). U većini slučajeva uočen je limfocitni infiltrat u meningama i perivaskularno nakupljanje limfocita (slika 24a i b).



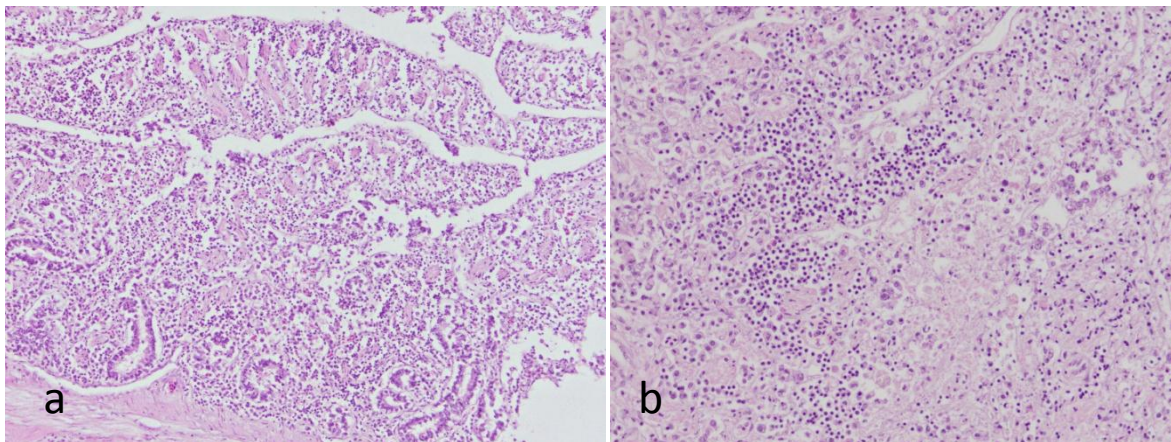
**Slika 23.** Mozak labudova. a) Encefalomalacija, HE x 400. b) Hemoragije u malom mozgu, HE x 100.





**Slika 24.** Mozak labudova. a) Limfocitni infiltrat u meningama, HE x 400; b) Perivaskularno nakupljanje limfocita, HE x 200.

U crevima kod pet jedinki (5/15) je utvrđen kataralni enteritis sa infiltracijom limfocita u submukozi (slika 25a i b).



**Slika 25.** Tanka creva labudova. a i b) Limfocitni infiltrat u submukozi. HEx100.

## 5.4. Imunohistohemijski nalaz

### 5.4.1. Ekspresija antigena virusa avijarne influence u tkivima labudova

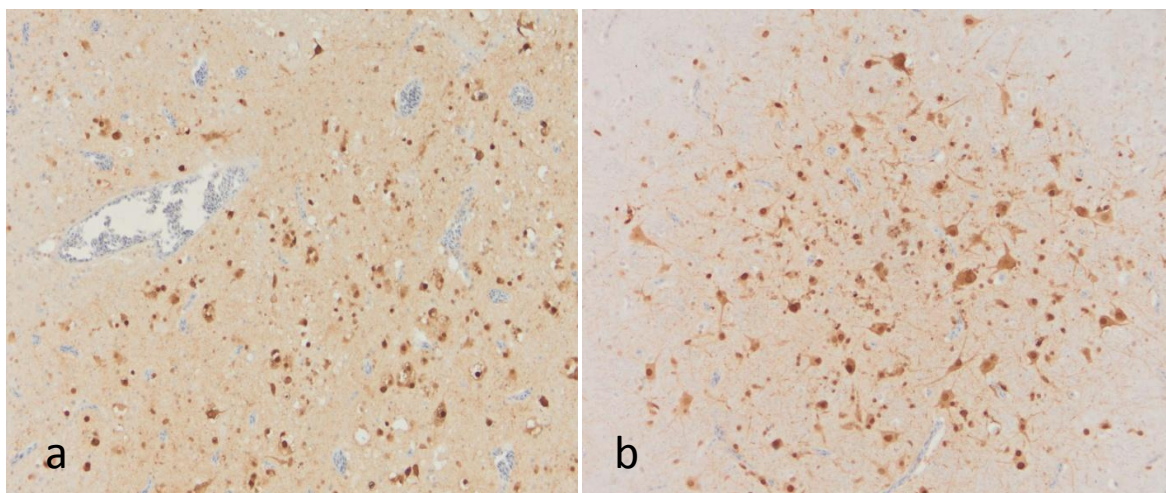
Antigen virusa avijarne influence (nukleoprotein) je imunohistohemijski dokazan u sledećim uzorcima tkiva labudova: mozak, pankreas, bubreg, slezina, pluća i srce. Virusni antigen nije detektovan u crevima ispitivanih labudova. Imunohistohemijski pozitivan signal prikazan je vidu pojedinačnih i difuznih zrnastih ili ovalnih homogenih struktura smeđe boje. Utvrđeno je da ćelije koje eksprimiraju virusni antigen uglavnom pokazuju citoplazmatsku reakciju. Količina i distribucija virusnog antigena je varirala u različitim organima. Intenzitet imunohistohemijske reakcije na antigen virusa avijarne influence u ispitivanim organima prikazan je u tabeli 12.

**Tabela 12:** Intenzitet imunohistohemijske reakcije na nukleoprotein virusa avijarne influence u ispitivanim organima labudova.

Organ	IHC				Broj IHC pozitivnih organa (n=15)	Intenzitet IHC reakcije
	-	+	++	+++		
<b>Mozak</b>	0/15	0/15	3/15	12/15	15/15	+++
<b>Slezina</b>	3/15	1/15	1/15	10/15	12/15	+++
<b>Pankreas</b>	0/15	0/15	4/15	11/15	15/15	+++
<b>Bubreg</b>	12/15	0/15	3/15	0/15	3/15	++
<b>Pluća</b>	4/15	9/15	2/15	0/15	11/15	+
<b>Srce</b>	9/15	5/15	1/15	0/15	6/15	+
<b>Creva</b>	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	-

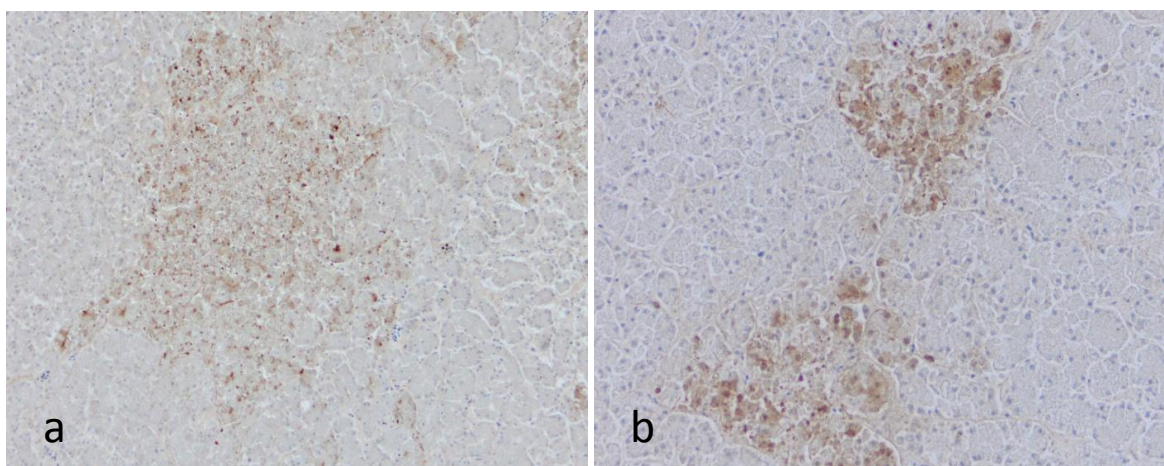
Legenda: Opis intenziteta reakcije: negativna reakcija (-); slabo pozitivna (+); umereno pozitivna (++); jaka reakcija (+++).

Virusni antigen je detektovan u citoplazmi i jedru neurona i glija ćelija u malom i velikom mozgu kod svih ispitanih labudova (15/15) (slika 26a i b).



**Slika 26.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u mozgu labudova: a) veliki mozak, x 200; b) mozak, IHC pozitivan signal u neuronima, x 200.

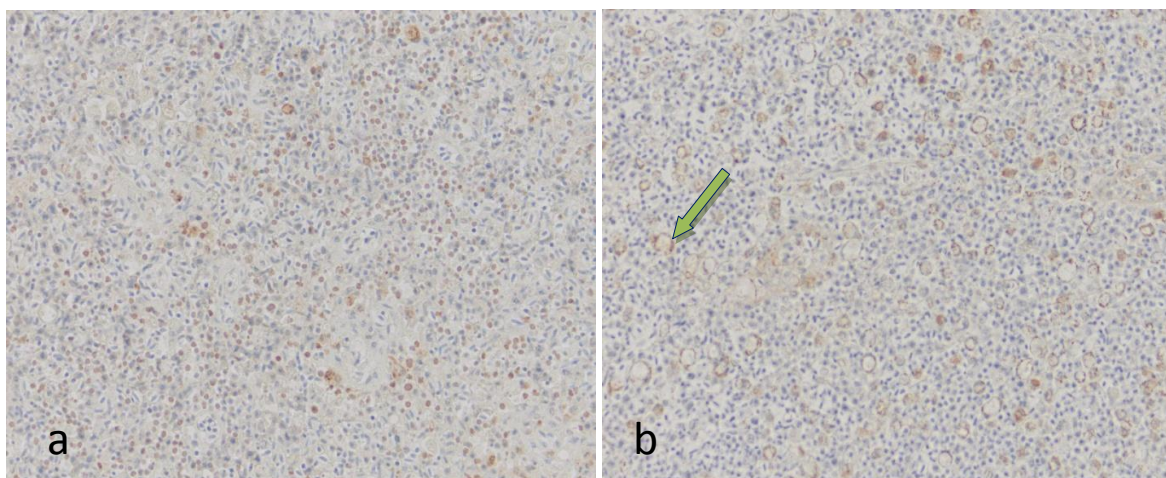
U pankreasu labudova, virusni antigen je detektovan u citoplazmi i jedru nekrotičnih ćelija, kao i u makrofagima u vidu zrnastim homogenih precipitata (slika 27a i b).



**Slika 27.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u pankreasu labudova: a) i b) pozitivne ćelije u nekrotičnim poljima x 200.

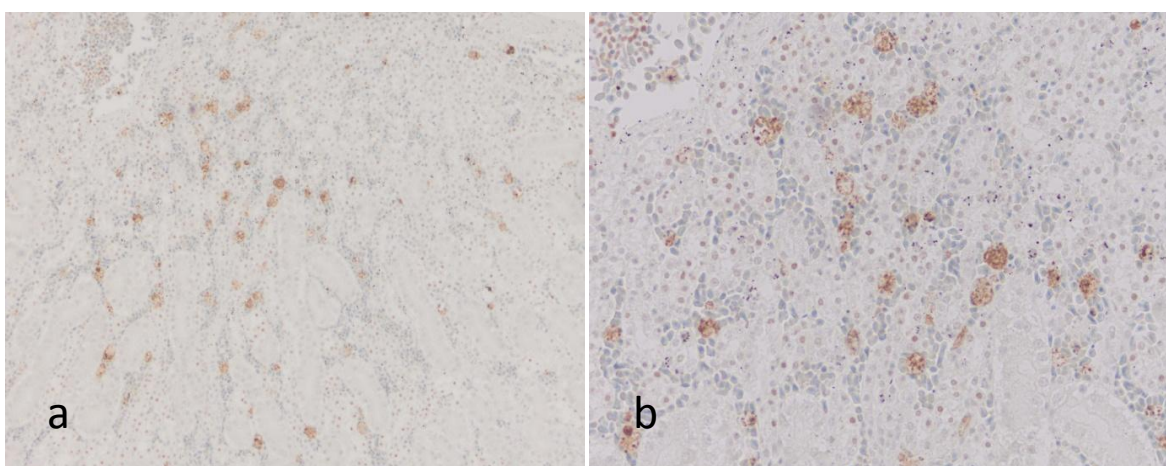


Veliki broj pozitivnih ćelija uočen je u nekrotičnim poljima slezine (slika 28a), kao i makrofagima i endotelnim ćelijama krvnih sudova (slika 28b).



**Slika 28.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u slezini labudova: a) pozitivni makrofagi u nekrotičnim poljima x 400 b) pozitivne endotelne ćelije (strelica), x 400.

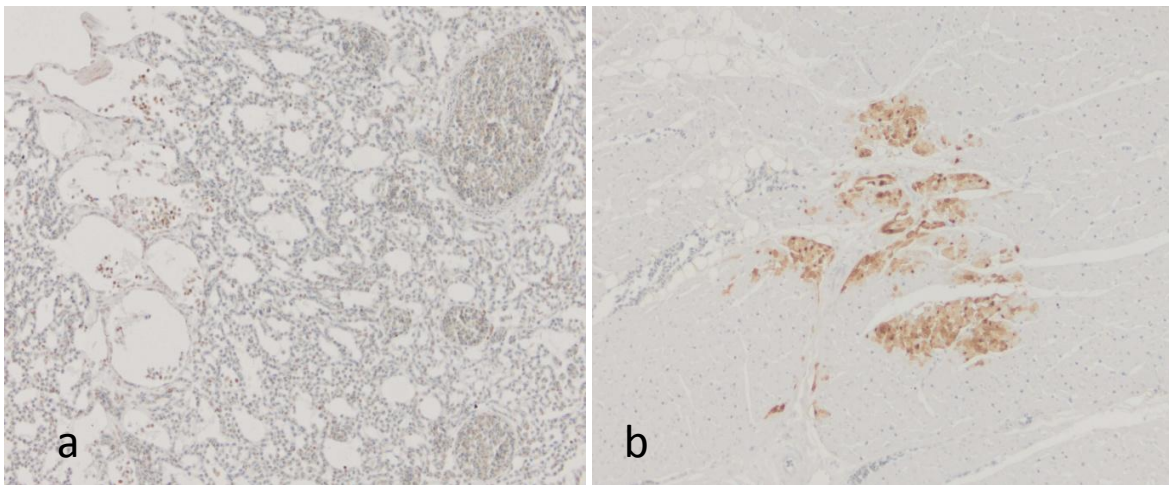
Virusni antigen je detektovan u epitelu tubula (slika 29a) kao i u endotelu glomerularnih kapilara bubrega (slika 29b).



**Slika 29.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u bubrezima labudova: a) pozitivne epitelne ćelije bubrega, x 200 b) detekcija virusnog antigena u endotelu kapilara bubrega, x 400.

U plućima, mali broj endotelnih ćelija i makrofaga u lumenu alveola je bio pozitivan na virus influence (slika 30a).

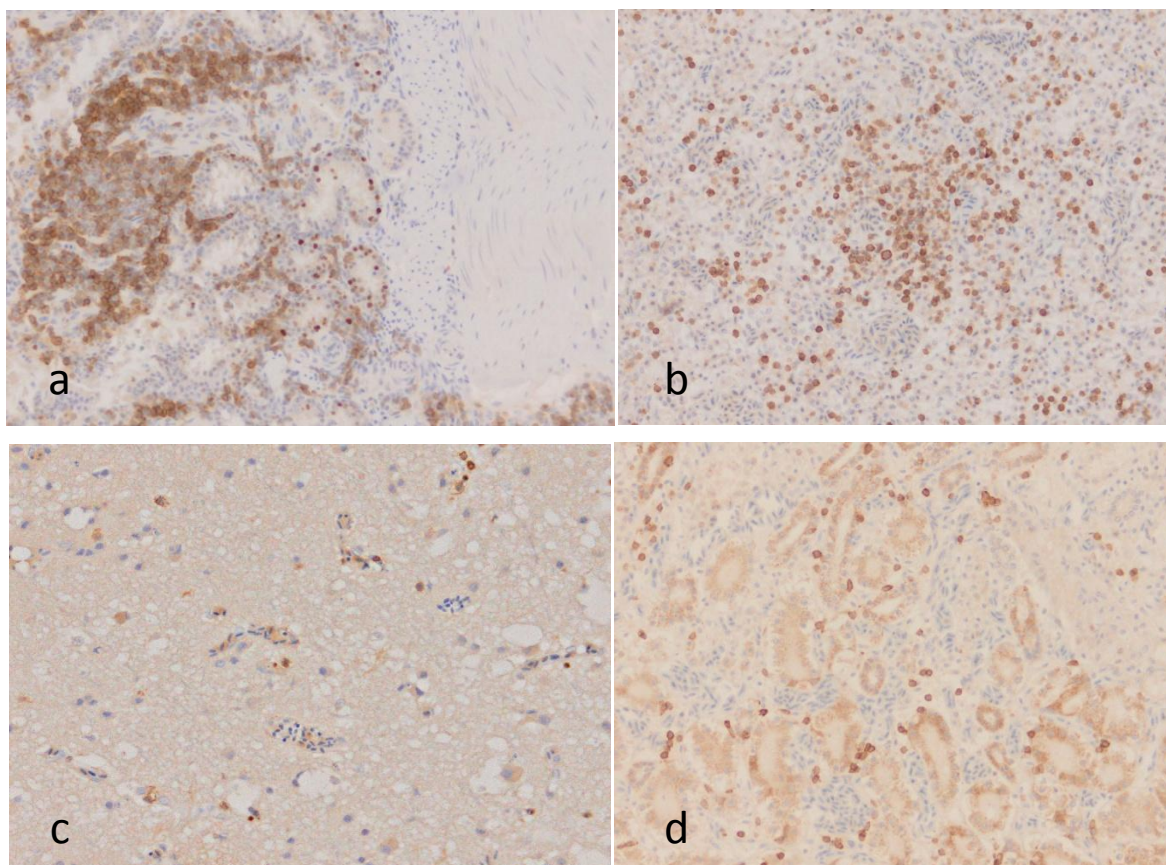
U srcu, mali broj kardiomiocita bio je pozitivan na nukleoprotein virusa avijarne influence, koji je eksprimiran u vidu smeđih precipitata (slika 30b).



**Slika 30.** a) Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u plućima labudova, pozitivni makrofagi u plućima, x 200 b) Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u srce labudova, IHC pozitivni kardiomiociti, x 200.

#### 5.4.2. Ekspresija CD3 antitela

Imunohistohemijским ispitivanjem uzoraka organa labudova inficiranih virusom avijarne influence podtipa H5N8 ustanovljeno je da se u mononuklearnom ćelijskom infiltratu nalazi veliki broj pozitivnih T limfocita. Najdominantniji nalaz CD3<sup>+</sup> T limfocita ustanovljen je u crevima (slika 31a), slezini (slika 31b), mozgu (slika 31c) i bubrezima (slika 31d).

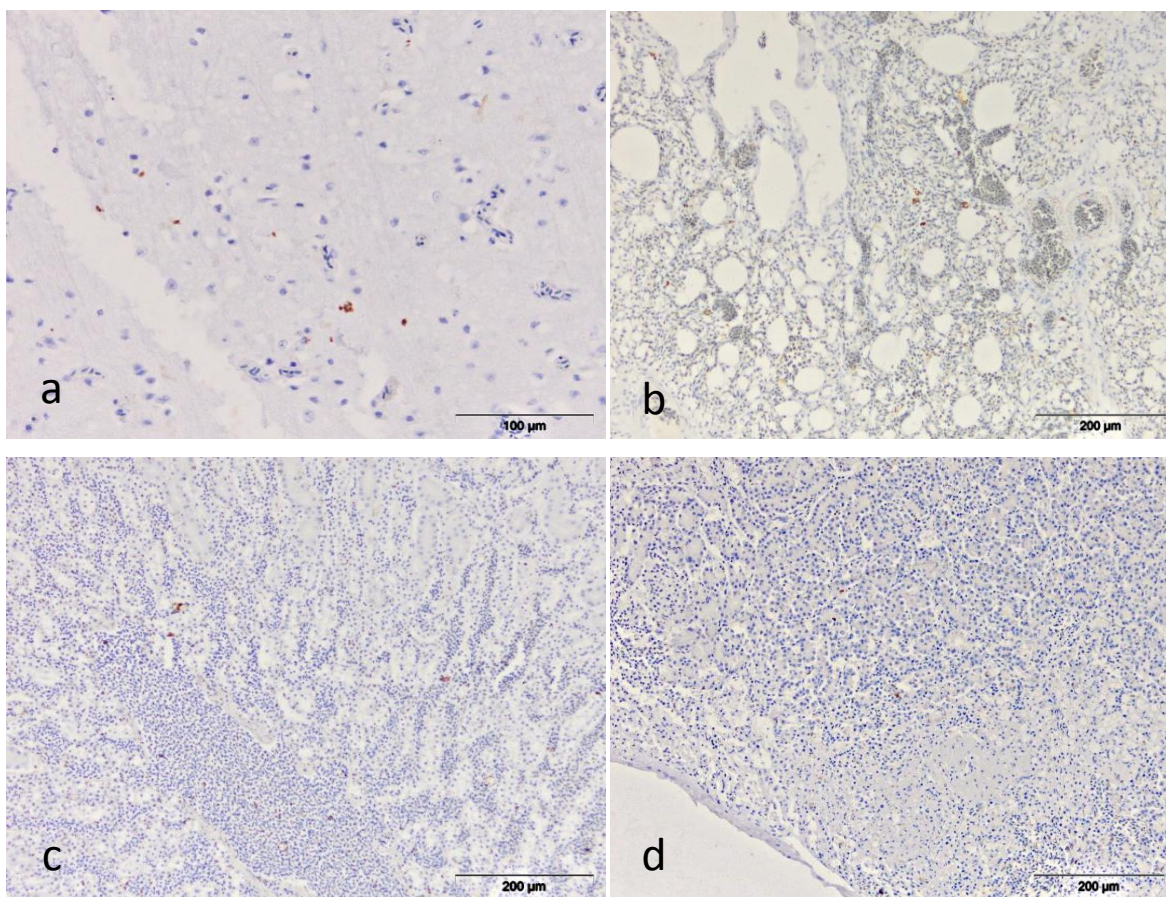


**Slika 31.** Ekspresija CD3 limfocita u organima labudova: a) creva x 400; b) slezina x 400; c) mozak x 400 d) bubreg x 400.



### 5.4.3. Ekspresija CD21 antitela

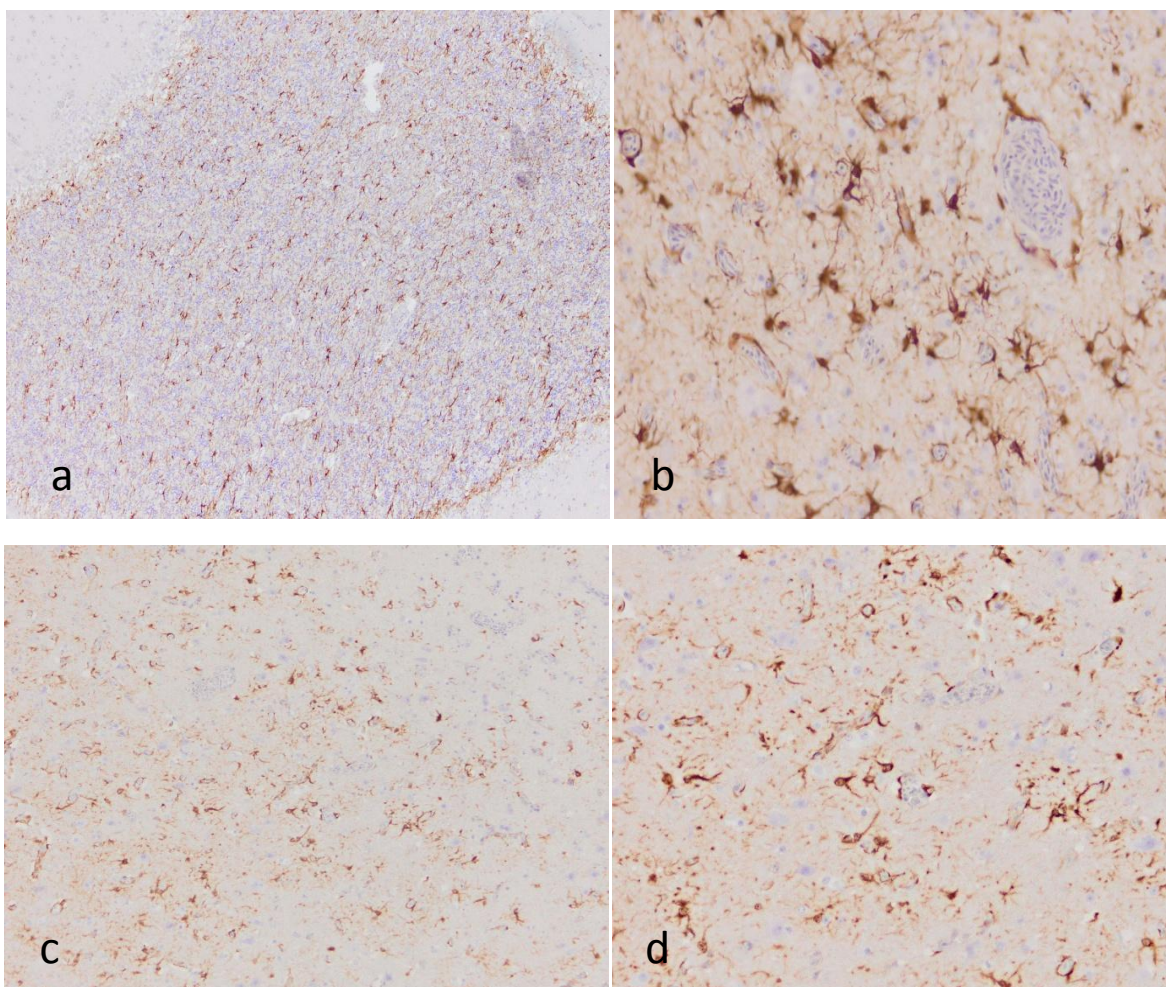
U ispitanim uzorcima organa labudova, ustanovljen je mali broj ćelija pozitivnih na CD21 ćelijski antigen. Ove ćelije pripadaju B limfocitima i bile su pojedinačno zastupljene u mononuklearnom ćelijskom infiltratu lokalizovanom u mozgu (slika 32a), plućima (slika 32b), bubrezima (slika 32c) i pankreasu (slika 32d).



**Slika 32.** Ekspresija CD21 limfocita u organima labuda. a) mozak x 400 b) pluća x 200 c) bubreg x 200) d) pankreas x 200.

#### 5.4.4. Ekspresija GFAP

Imunohistohemijским bojenjem ispitivanog moždanog tkiva labudova na glijalni kiseli protein (*eng.* Glial fibrillary Acidic Protein – GFAP) ustanovljeno je da se javlja astrocitoza (slika 33a). Imunohistohemijski pozitivni astrociti na GFAP kod većine labudova su bili otečeni i hipertofisani (slika 33 b,c,d).



**Slika 33.** Ekspresija glijalnog kiselog proteina u mozgu labudova: a) GFAP+ astrociti u malom mozgu x 100 b) mali mozak x 400; c) Veliki mozak, GFAP+ astrociti x 200; d) Veliki mozak, GFAP+ astrociti x 200.



## 5.5. Rezultati patomorfološkog ispitivanja kod kokošaka

### 5.5.1. Makroskopski nalaz na organima kokošaka

Spoljašnjim pregledom leševa kokošaka, promene u vidu blage cijanoze i nekroze kreste i podbradnjaka ustanovljene su kod dve ispitane jedinke (2/15) (slika 34). Kod ostalih kokošaka nisu utvrđene promene na koži glave, vrata i nogu.



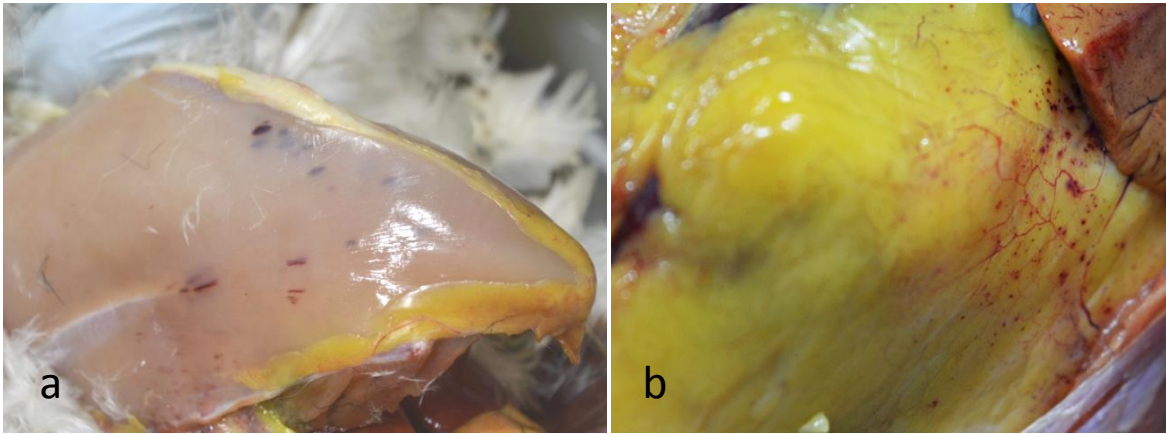
**Slika 34.** Cijanoza kreste i podbradnjaka kokoške

Unutrašnjim pregledom ustanovljena je ravnomerna zastupljenost masnog tkiva i dobra uhranjenost svih jedinki. Makroskopskim pregledom leševa kokošaka, promene su utvrđene na sledećim organima: srce, pluća, creva, slezina, bubrezi i mozak. Učestalost utvrđenih promena na ovim organima prikazana je u tabeli 13. Na tkivu pankreasa nisu utvrđene makroskopski vidljive promene.

**Tabela 13:** Učestalost ustanovljenih makroskopskih promena u odabranim organima kokošaka.

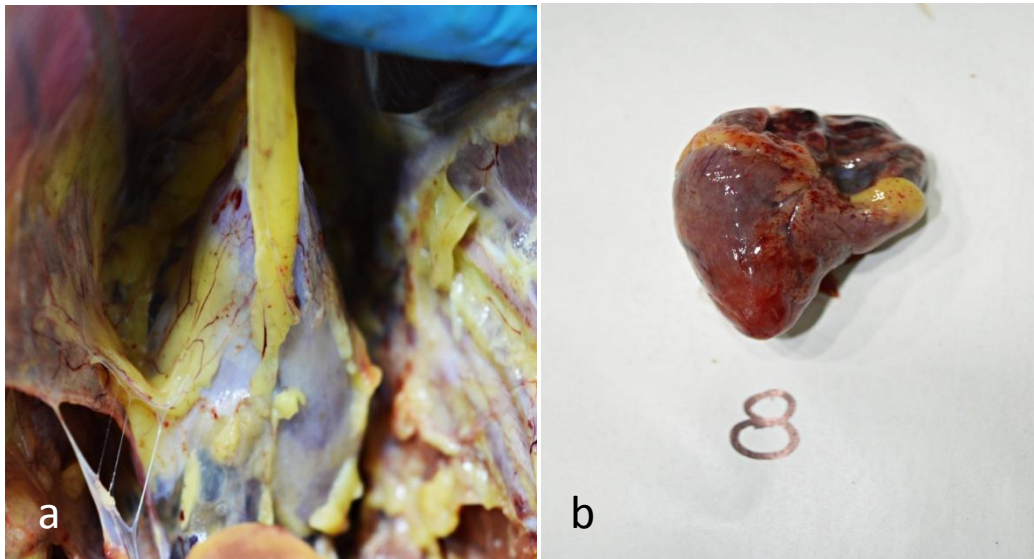
<b>Organ</b>	<b>Tip promene</b>	<b>Učestalost promena (%)</b>	
<b>Mozak</b>	Hiperemija	14/15	93.3%
	Edem	1/15	6.6%
	Krvavljenja	0/15	0
<b>Pankreas</b>	Multifokalne nekroze	0/15	0
	Petehijalna krvavljenja	0/15	0
	Krvavljenje	0/15	0
<b>Bubreg</b>	Kongestija	6/15	40%
	Krvavljenje	4/15	26.6%
<b>Creva</b>	Petehijalno krvavljenje na serozi	7/15	46.6%
	Hemoragičan sadržaj u lumenu	5/15	33.3%
	Hemoragije u mukozi	3/15	20%
<b>Srce</b>	Subepikardijalna krvavljenja	11/15	73.3%
	Prugasta krvavljenja u endokradu	7/15	46.6%
	Petehije u masnom tkivu epikarda	12/15	80%
<b>Slezina</b>	Kongestija	4/15	26.6%
	Nekroze	10/15	66.6%
	Splenomegalija	3/15	20%
<b>Pluća</b>	Kongestija	4/15	26.6%
	Krvavljenje	9/15	60%
	Edem	8/15	53.3%

Pregledom mišića utvrđena su tačkasta i prugasta krvavljenja u grudnoj muskulaturi kod dve jedinke (2/15) (slika 35a). Veoma diskretna tačkasta krvarenja na mezenterijalnom masnom tkivu ustanovljena su kod tri jedinke (3/15) (slika 35b).



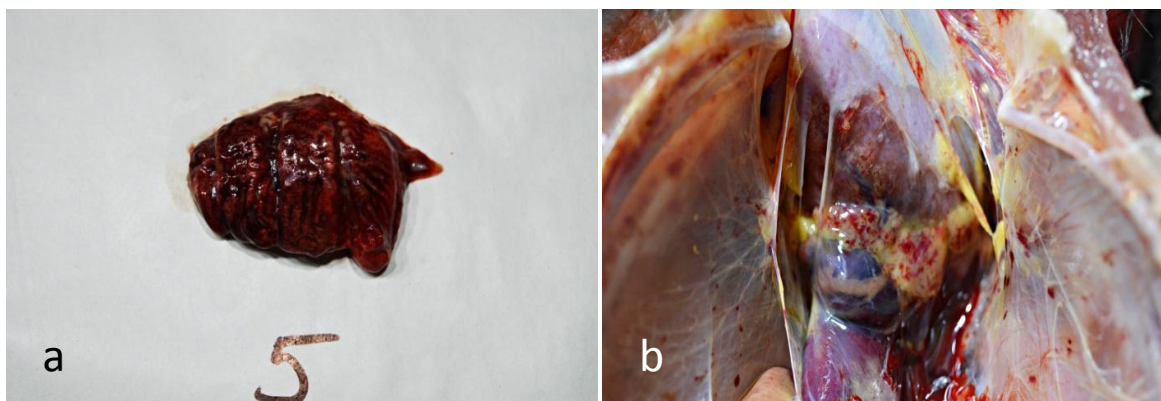
**Slika 35.** a) Makroskopski nalaz na grudnoj muskulaturi kokoške, prugasta krvavljenja; b) Makroskopski nalaz na masnom tkivu abdomena kokoške, tačkasta krvavljenja.

Najdominantniji makroskopski nalaz kod većine ispitanih kokošaka bilo je petehijalno krvavljenje u masnom tkivu osrčja (12/15) (slika 36a). Subepikardijalna krvavljenja uočena su kod jedanaest kokošaka (11/15) (slika 36b), dok je prugasto krvavljenje u miokardu zapaženo kod sedam jedinki (7/15).



**Slika 36.** Makroskopski nalaz na srcu kokošaka. a) subepikardijalna krvavljenja; b) petehijalna krvavljenja u masnom tkivu osrčja.

Makroskopskim pregledom pluća, čest nalaz su predstavljale hemoragije (9/15) i edem (8/15). Pluća su bila uvećana, tamno crvene boje, zaobljenih rubova, na preseku ispunjena hemoragično-penušavim sadržajem (slika 37a). Torakalne vazdušne kese su bile zamućenog izgleda, na površini su uočena tačkasta krvavljenja kod polovine ispitanih kokošaka (slika 37b).

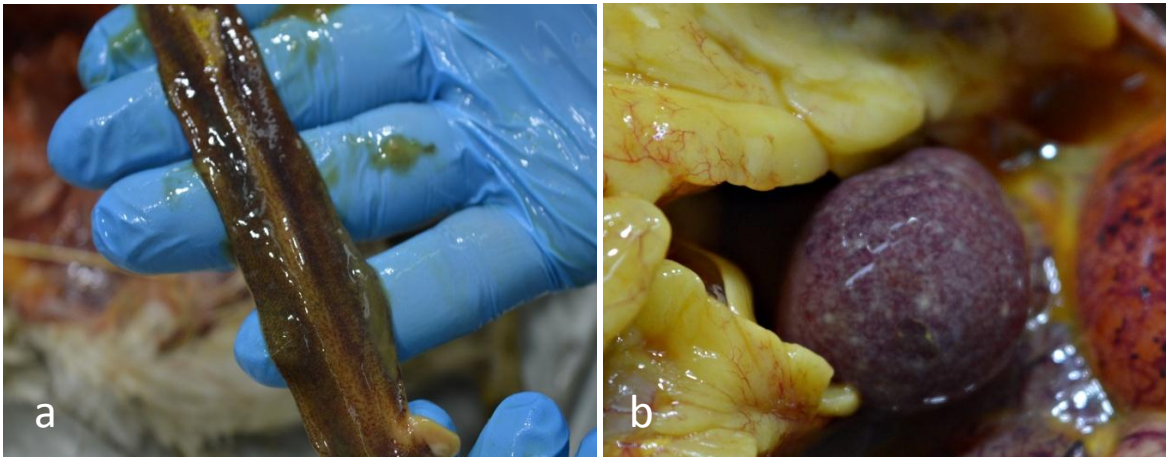


**Slika 37.** a) Makroskopski nalaz na plućima kokoške. Pluća su uvećana, otečena, uočavaju se hemoragije i kongestija; b) Makroskopski nalaz na torakalnim vazdušnim kesama: uočavaju se tačkasta krvavljenja.

Promene na crevima bile su u vidu kataralnog enteritisa, mukoze su bile hiperemične i hemoragične, lumen creva kod pet jedinki je bio ispunjen tečnim hemoragičnim sadržajem (5/15). Petehije na serozi su uočene kod sedam jedinki (7/15), dok je krvavljenje u mukozi bilo kod tri jedinke (3/15) (slika 38a). Krvni sudovi mezenterijuma bili su inicirani, hiperemični, dok su zidovi tankih creva kod pet jedinki bili zadebljani.

Na slezini su makroskopskim pregledom ustanovljena bela nekrotična polja kod većine jedinki (10/15) (slika 38b). Redak nalaz bila je kongestija i uvećanje slezine (3/15).

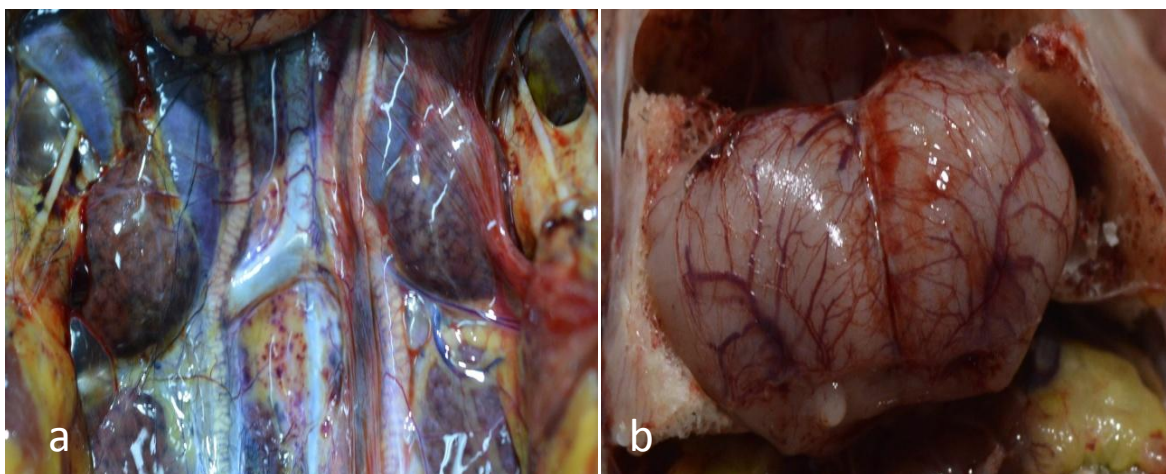




**Slika 38.** a) Makroskopski nalaz na tankim crevima kokoške. Hemoragije u mukozi tankih creva; b) Makroskopski nalaz na slezini kokoške. Na površini se uočavaju bela, nekrotična polja.

Makroskopskim pregledom bubrega, promene su ustanovljene kod četiri jedinke (4/15) u vidu kongestije bubrega i kod šest kokošaka slučaja su uočene hemoragije (6/15) (slika 39a).

Na mozgu većine ispitanih jedinki uočena je hiperemija i iniciranost krvnih sudova (14/15) (slika 39b). Kod jedne jedinke je uočen edem mozga.



**Slika 39.** a) Makroskopski nalaz na bubrezima kokoške. Hemoragije i kongestija bubrega. b) Makroskopski nalaz na mozgu kokošaka. Iniciranost i hiperemija krvnih sudova mozga.

### 5.5.2. Patohistološki nalaz na organima kokošaka

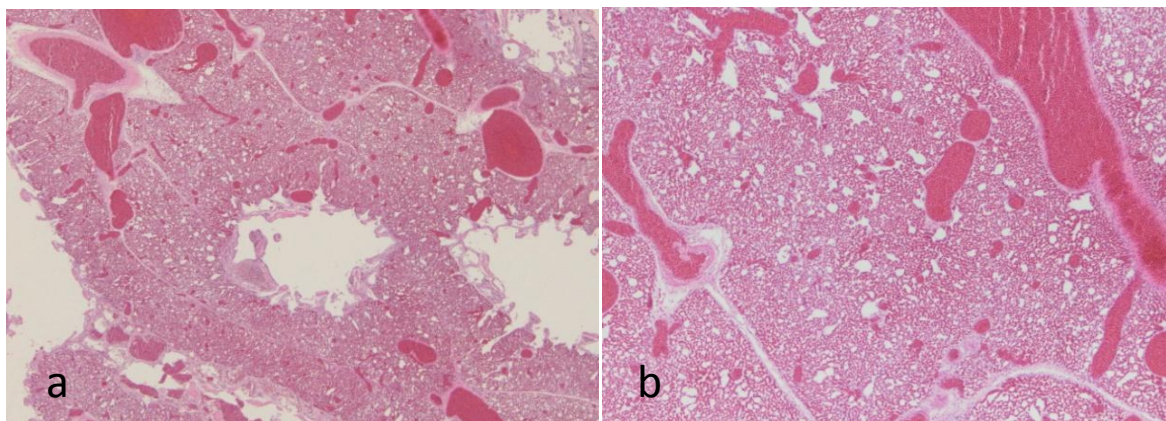
Patohistološkim ispitivanjem organa kokošaka ustanovljene su promene na mozgu, srcu, crevima, pankreasu, plućima, slezini i bubrezima. Vrsta promena, kao i njihova učestalost u odabranim organima prikazani su u tabeli 14.

**Tabela 14:** Učestalost i vrsta ustanovljenih patohistoloških lezija u organima kokošaka

Organ	Tip promene	Učestalost promena (%)	
Mozak	Neuronalna satelitoza	9/15	60%
	Neuronofagija	10/15	66.6%
	Limfocitni infiltrat	14/15	93.3%
	Encefalomalacija	3/15	20%
	Krvavljenje	3/15	20%
	Fokalne nekroze	6/15	40%
	Perivaskularno nakupljanje limfocita	13/15	86.6%
	Meningoencefalitis	12/15	80%
	Degeneracija neurona	6/15	40%
	Glioza	7/15	46.6%
Pankreas	Multifokalna nekroza sa infiltracijom mononuklearnih ćelija	15/15	100%
	Krvavljenje	0/15	0
	Petehije	0/15	0
	Vakuolizacija citoplazme	8/15	53.3%
Bubreg	Krvavljenja	6/15	40%
	Hiperemija	8/15	53.3%
	Tubulonekroze	5/15	33.3%
	Nakupine mononuklearnog infiltrata	3/15	20%
Creva	Kataralni enteritis	7/15	46.6%
	Limfocitni infiltrat	7/15	46.6%
Srce	Subepikardijalne petehije	11/15	73.3%
	Krvavljenja u miokardu	7/15	46.6%
	Limfocitni infiltrat u perimizijumu	4/15	26.6%
	Degeneracija kardiomiocita	3/15	20%
Slezina	Multifokalne nekroze limfatičnog tkiva u beloju pulpi	10/15	66.6%
	Krvavljenje	9/15	60%
	Hemosideroza	6/15	40%
	Hiperemija	7/15	46.6%
Pluća	Hiperemija	11/15	73.3%
	Krvavljenja	9/15	60%
	Kongestija	4/15	26.6%
	Edem	8/15	53.3%
	Intersticijalna pneumonija	0/15	0



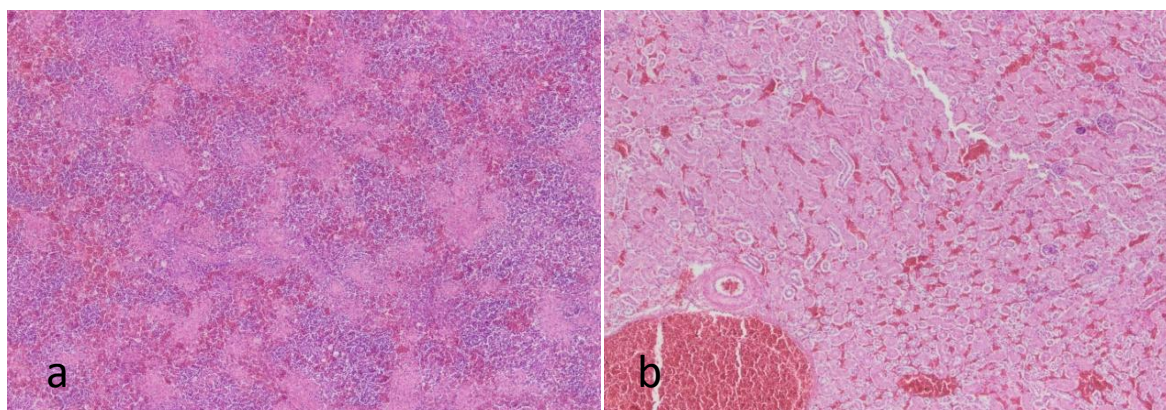
U plućima većine ispitanih kokošaka, ustanovljene su hemoragije i hiperemija krvnih sudova (slika 40a i b).



**Slika 40.** Pluća kokoške a) Masivna krvavljenja, HE x 40; b) Hiperemija krvnih sudova i krvavljenja, HE x 100

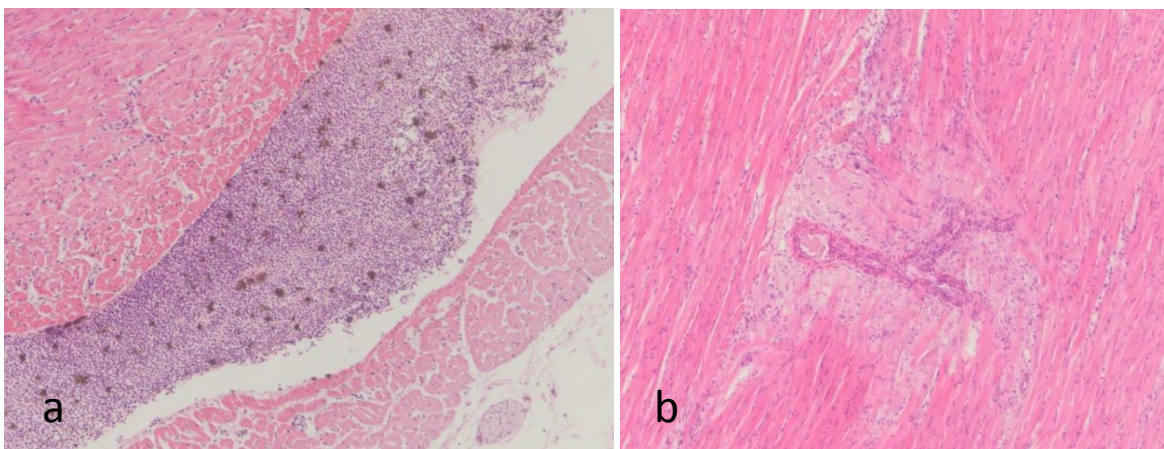
U isečcima slezine, u crvenoj pulpi, izražena je hiperemija krvnih sudova i krvavljenja kod 11 ispitanih kokošaka (11/15) (slika 41a).

U bubrezima kod 8 kokošaka (8/15) zapaženo je krvavljenje i hiperemija krvnih sudova (slika 41b), dok je nalaz tubulonekroze utvrđen kod 4 kokoške (4/15).



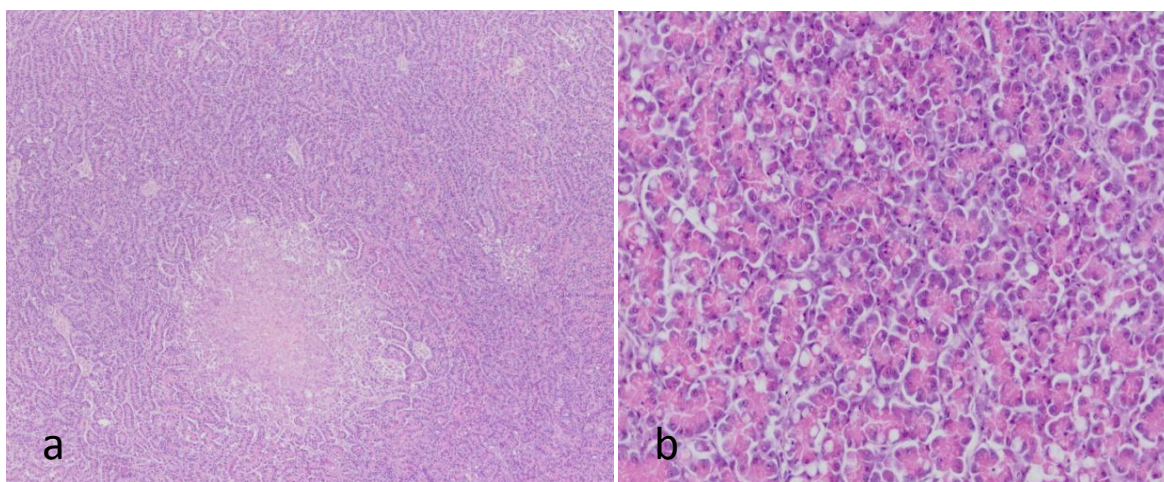
**Slika 41.** a) Slezina kokoške, krvavljenja, HE x 100; b) Bubrež kokoške, hiperemija krvnih sudova i hemoragije, HE x 100

Prilikom patohistološkog pregleda srca zapažena su subepikardijalna krvavljenja kod 8 kokošaka (8/15), krvavljenja u miokardu kod 4 kokoške (4/15), nalaz hemosideroze kao posledica obilnog krvavljenja kod 4 kokoške (4/15) (slika 42a), distrofija kardiomiocita kod 2 kokoške (2/15) (slika 42b).



**Slika 42.** Srce kokoške a) Hemosideroza, HE x 200; b) Distrofija, HE x 200.

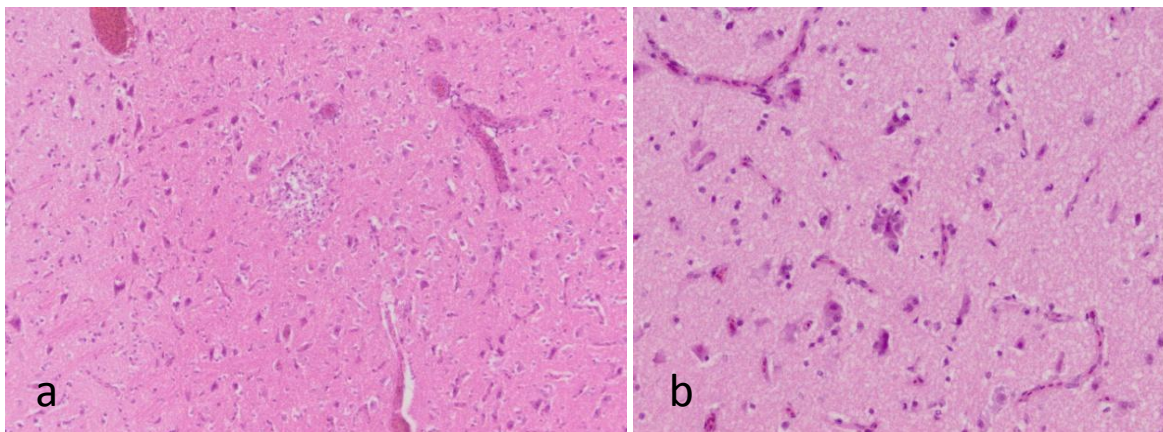
Dominantan nalaz u pankreasu bile su nekroze, koje su utvrđene kod 11 ispitanih kokošaka (11/15) (slika 43a). U ćelijama egzokrinog pankreasa uočava se vakuolizacija citoplazme (slika 43b).



**Slika 43.** Pankreas kokoške : a) Nekrotična polja, HE x 100; b) Vakuolizacija, HE x 400.

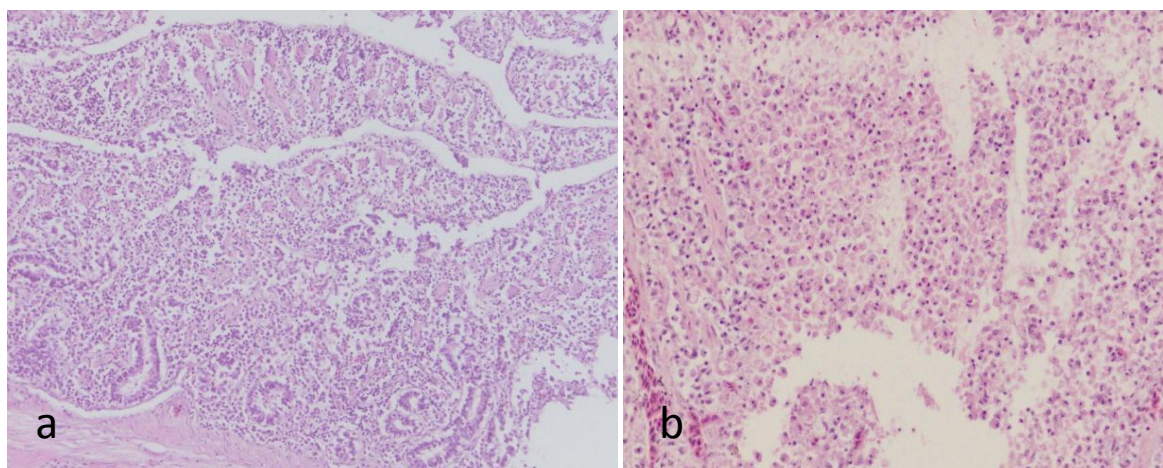


Pregledom moždanog tkiva uočene su promene u vidu glioze, hiperemije krvnih sudova, encefalomalacije, satelitoze sa neuronofagijom.



**Slika 44.** Patohistološki nalaz na mozgu kokošaka: a) encefalomalacija, HE x 200 b) satelitoza sa neuronofagijom, HE x 400.

Na crevima je uočena infiltracija limfocitima, karioreksa i kataralni enteritis kod sedam ispitanih jedinki (7/15) (slika 45a i b).



**Slika 45.** Patohistološki nalaz na crevima kokošaka: a) infiltracija limfocitima, HE x 200 b) karioreksa, HE x 400.

## 5.6. Imunohistohemijski nalaz

### 5.6.1. Ekspresija antigena virusa avijarne influence u tkivima kokošaka

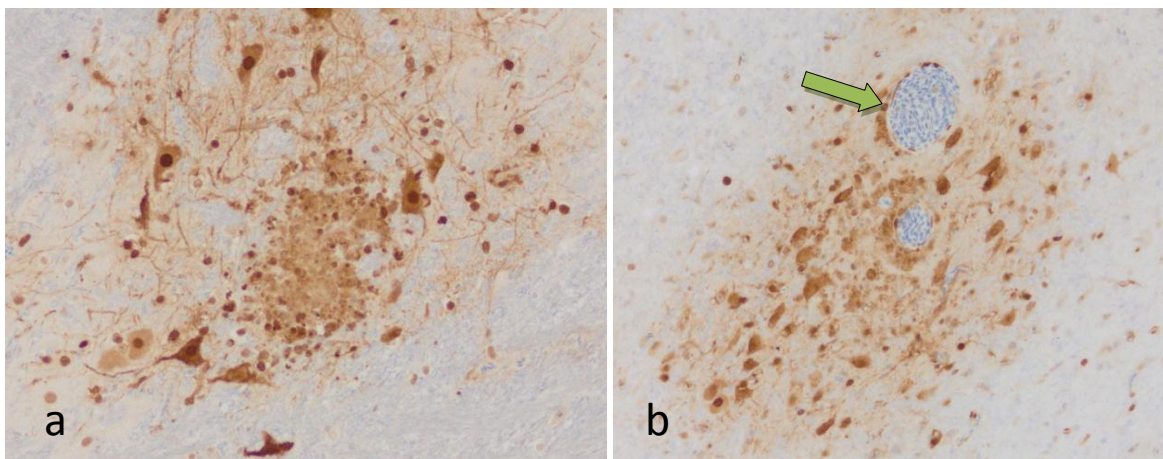
Antigen virusa influence (nukleoprotein) je imunohistohemijski dokazan u svim ispitivanim organima kokošaka. Pozitivan signal u vidu pojedinačnih i difuznih zrnastih ili ovalnih homogenih precipitate smeđe boje zapažen je u sledećim organima: mozak, pankreas, bubreg, slezina, pluća, srce i creva. Intenzitet imunohistohemijske reakcije na antigen virusa avijarne influence u ispitivanim organima prikazan je u tabeli 15. Intenzitet reakcije je opisan na sledeći način: negativna reakcija (-); slabo pozitivna (+); umereno pozitivna (++); jaka reakcija (+++).

**Tabela 15.** Intenzitet imunohistohemijske reakcije na nukleoprotein virusa avijarne influence u ispitivanim organima kokošaka.

Organ	IHC				Broj IHC pozitivnih organa (n=15)	Intenzitet IHC reakcije
	-	+	++	+++		
<b>Mozak</b>	0/15	0/15	6/15	9/15	15/15	+++
<b>Slezina</b>	5/15	0/15	3/15	7/15	10/15	+++
<b>Pankreas</b>	0/15	0/15	6/15	9/15	15/15	+++
<b>Bubreg</b>	9/15	1/15	4/15	1/15	6/15	++
<b>Pluća</b>	3/15	0/15	2/15	10/15	12/15	+++
<b>Srce</b>	4/15	1/15	3/15	7/15	11/15	+++
<b>Creva</b>	8/15	0/15	2/15	5/15	7/15	+++

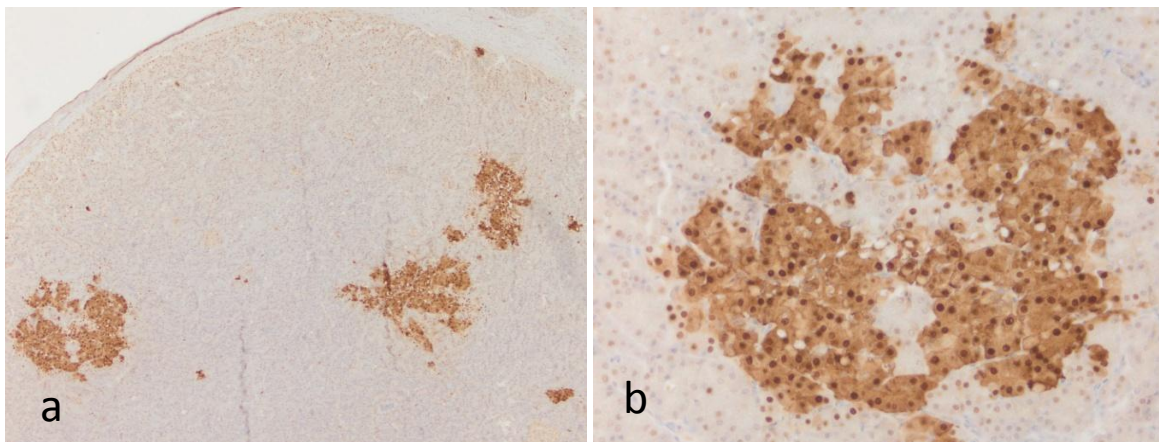
Legenda: Opis intenziteta reakcije: negativna reakcija (-); slabo pozitivna (+); umereno pozitivna (++); jaka reakcija (+++).

Intenzivna ekspresija virusnog antigena detektovana je u citoplazmi i jedru neurona i glija ćelija u malom i velikom mozgu (slika 46a) kao i u endotelnim ćelijama krvnih sudova mozga (slika 46b).



**Slika 46.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u mozgu kokošaka: a) Pozitivni neuroni u velikom mozgu, x 400; b) IHC pozitivan signal u neuronima i u endotelu krvnih sudova (strelica), x 400.

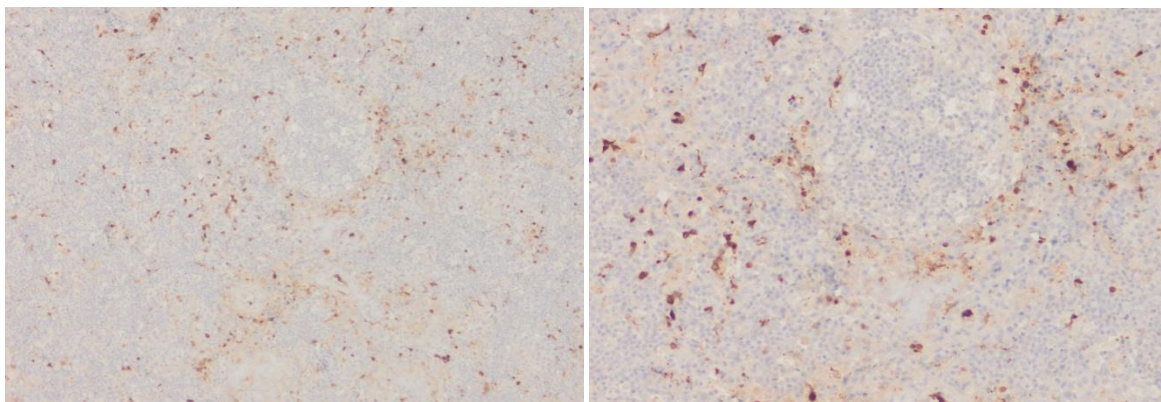
U pankreasu svih ispitanih kokošaka, virusni antigen je detektovan u citoplazmi i jedru nekrotičnih ćelija, kao i u makrofagima u formi zrnastih citoplazmatskih precipitata smeđe boje (slika 47a i b).



**Slika 47.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u pankreasu kokošaka: a) pozitivne ćelije u nekrotičnim poljima X 200; b) pozitivne ćelije u nekrotičnim poljima x 400.

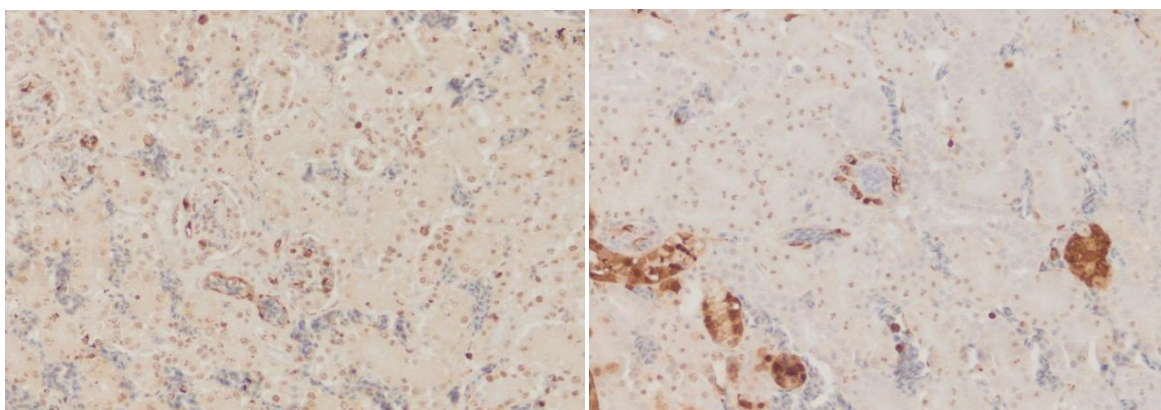


Veliki broj ćelija pozitivnih na nukleoprotein uočen je pretežno u crvenoj pulpi slezine, odnosno u makrofagima i endotelnim ćelijama krvnih sudova (slika 48a i b).



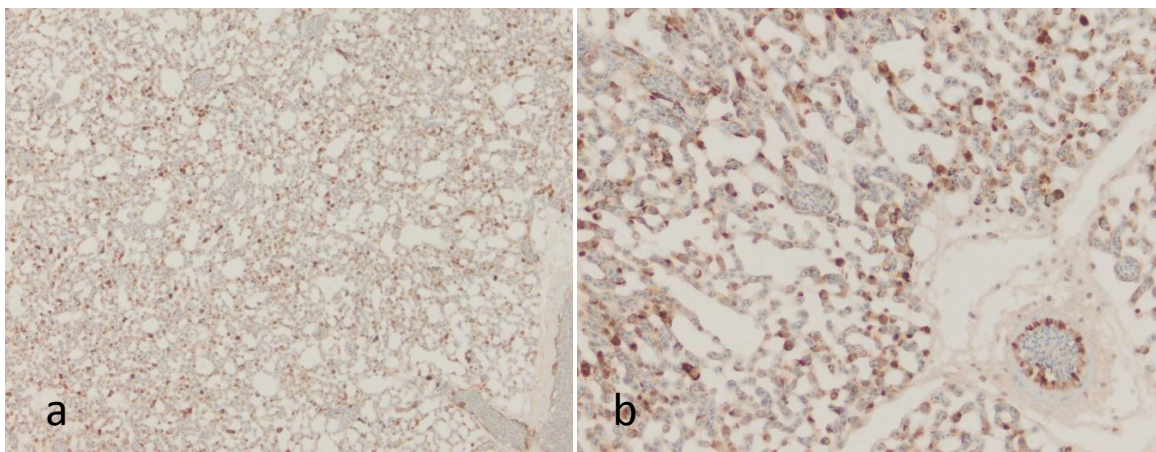
**Slika 48.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u slezini kokošaka: a) IHC pozitivni makrofagi u slezini, x 200 b) x IHC pozitivni makrofagi i endotelne ćelije x 400.

U bubrezima, virusni antigen je detektovan u epitelu tubula (slika 49a) kao i u endotelu glomerularnih kapilara bubrega (slika 49b).



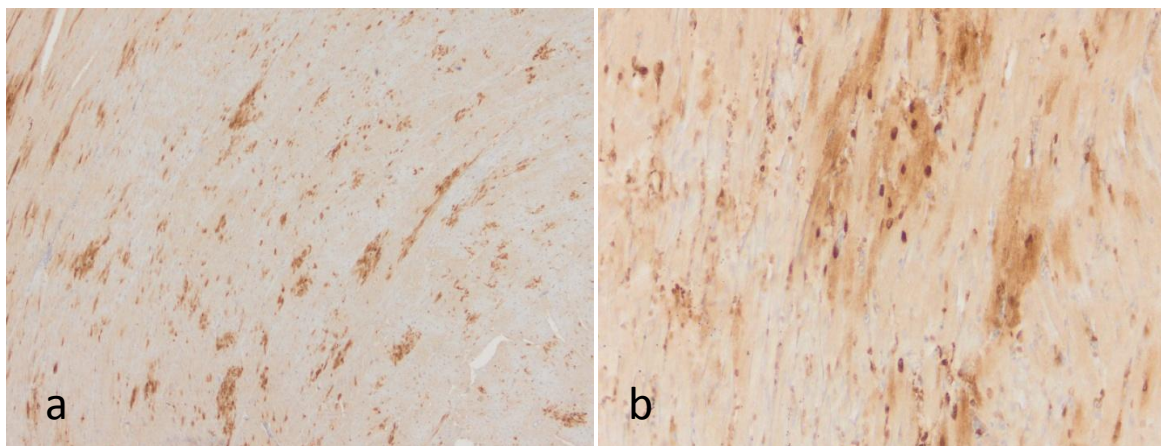
**Slika 49.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u bubregu kokošaka: a) IHC pozitivne epitelne ćelije tubula, x 400 b) IHC pozitivne endotelne ćelije glomerula, x 400.

Velika količina virusnog antigena utvrđena je u plućima. Virusni antigen je najviše eksprimiran u endotelnim ćelijama (slika 50a), kao i u makrofagima u lumenu alveola (slika 50b).



**Slika 50.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u plućima kokošaka: a) IHC pozitivne endotelne ćelije u plućima, x 200 b) IHC pozitivne makrofagi u lumenu alveola x 400.

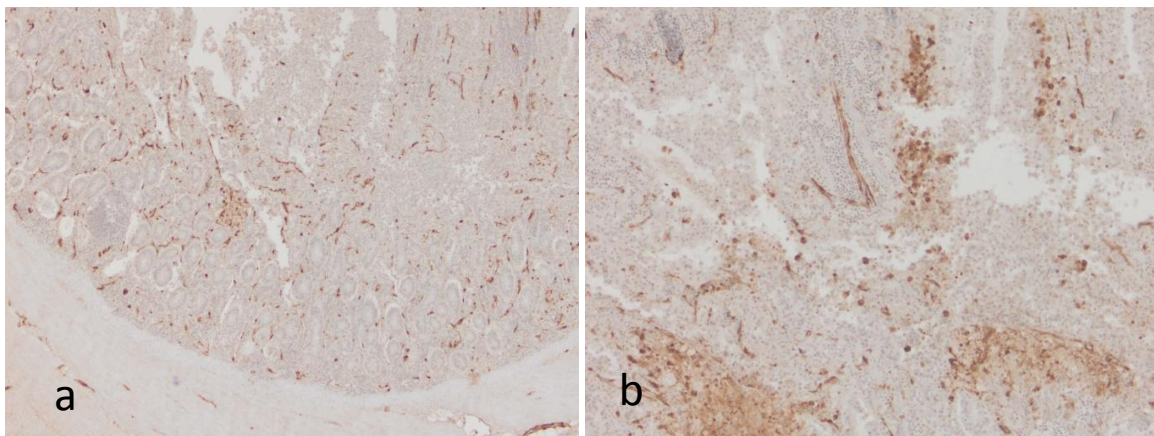
U srcu, veliki broj kardiomiocita bio je pozitivan na virusni antigen u vidu citoplazmatske reakcije (slika 51a i b).



**Slika 51.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u srcu kokošaka: a) imunopozitivni kardiomiociti x 100 b) imunopozitivni kardiomiociti x 400.



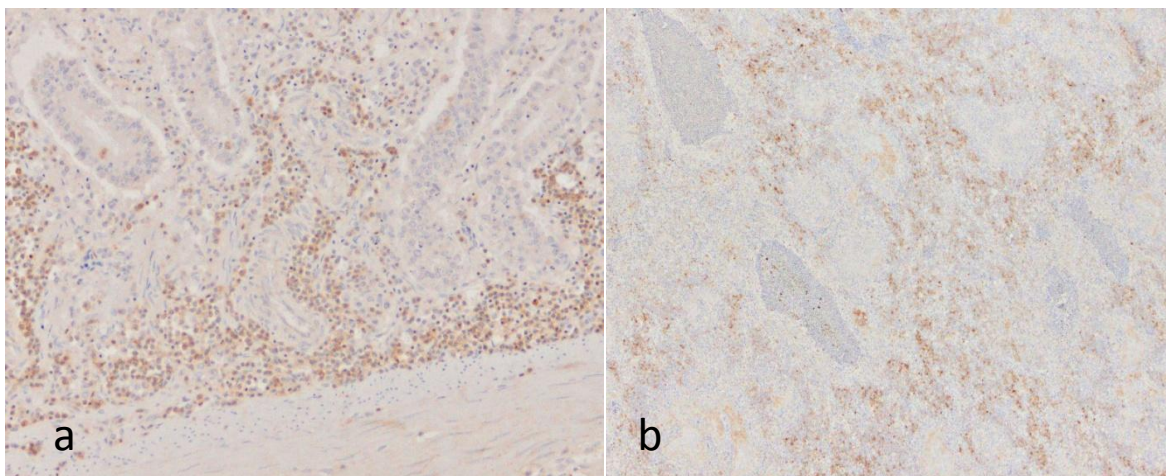
U crevima, virusni antigen je detektovan u mononuklearnim ćelijama u submukozi kod sedam jedinki (slika 52a i b).



**Slika 52.** Imunohistohemijski nalaz nukleoproteina virusa influence u crevima kokošaka: a) imunopozitivne mononuklearne ćelije u submukozi x 100 b) x imunopozitivne mononuklearne ćelije u submukozi 200.

### 5.6.2. Ekspresija CD3 antitela

Najintenzivnija ekspresija CD3+ T limfocita ustanovljena je u crevima (slika 53a) i slezini inficiranih kokošaka (slika 53b).

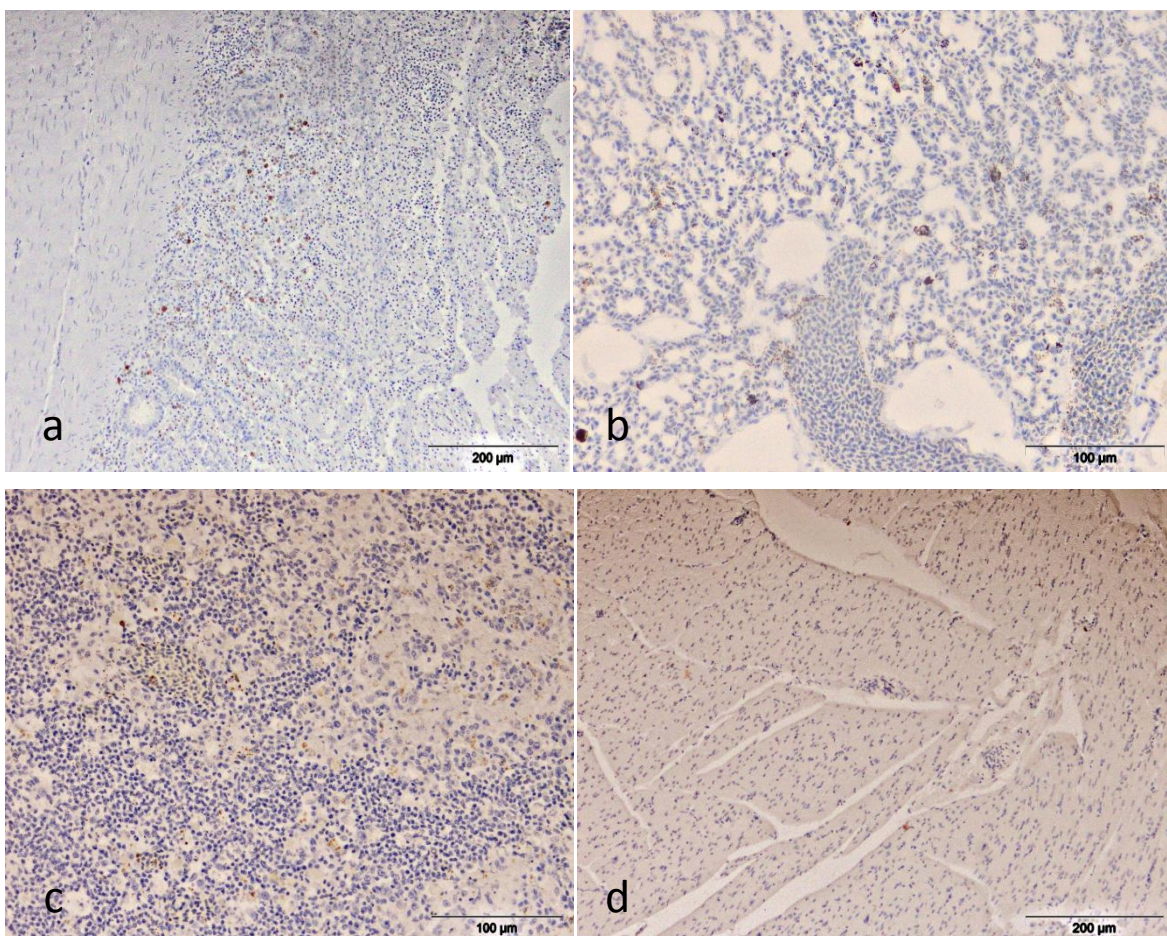


**Slika 53.** Ekspresija CD3 limfocita u organima kokošaka: a) creva x 400; b) slezina x 100.



### 5.6.3. Ekspresija CD21 antitela

U ispitanim uzorcima organa kokošaka, ustanovljen je mali broj ćelija pozitivnih na CD21 ćelijski antigen. Ove ćelije pripadaju B limfocitima i bile su pojedinačno zastupljene u mononuklearnom ćelijskom infiltratu lokalizovanom u crevima, plućima, slezini i srcu (slika 54a, b, c i d).

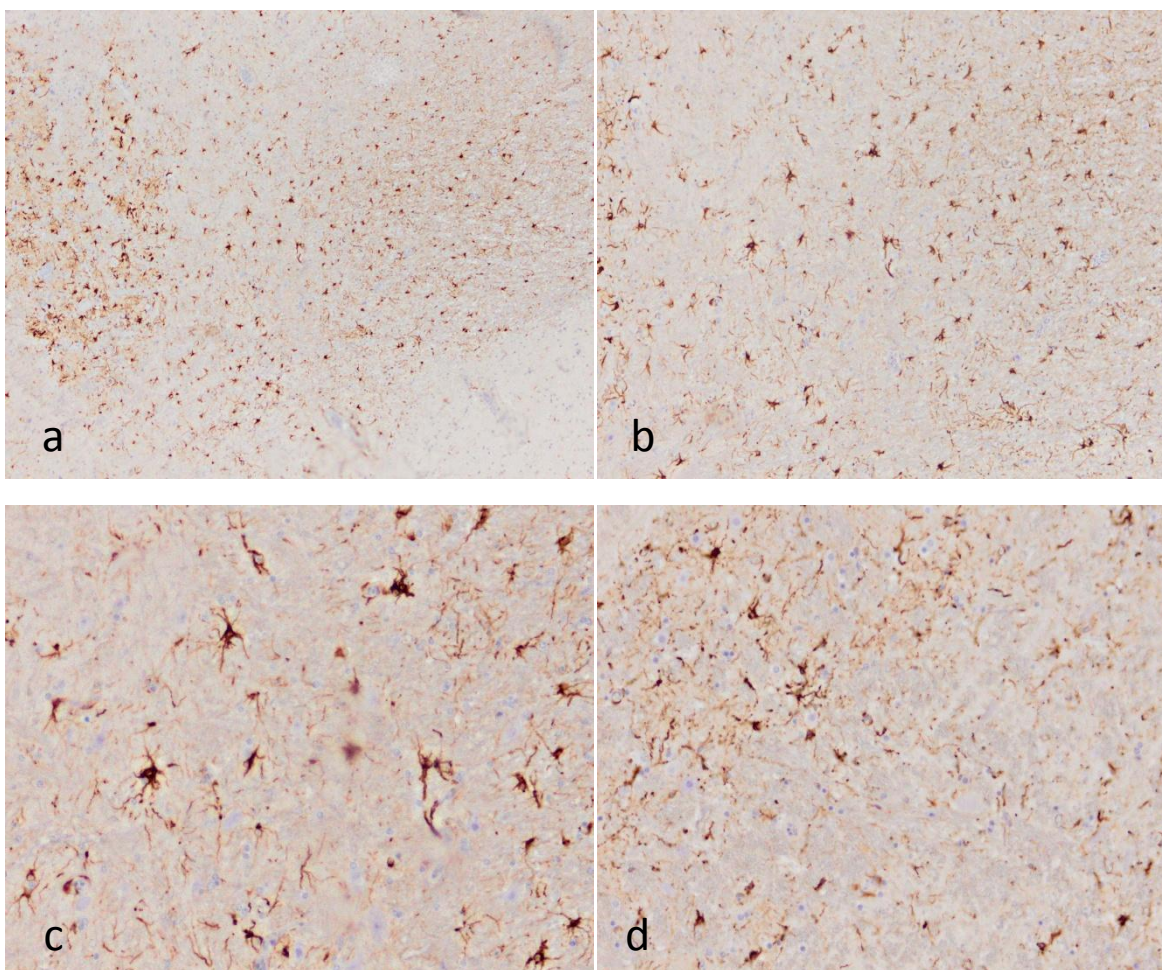


**Slika 54.** Ekspresija CD21 limfocita u organima kokošaka. a) Creva kokoške, x 200 b) Pluća kokoške x 400. c) Slezina kokoške x 400; d) Srce kokoške x 200.



#### 5.6.4. Ekspresija GFAP

Imunohistohemijskim bojenjem ispitivanog moždanog tkiva kokošaka na glijalni kiseli protein (*eng.* Glial fibrillary Acidic Protein – GFAP) ustanovljena je astrocitoza. Astroцити su ekspimirali GFAP u vidu citoplazmatske reakcije (slika 55a, b, c i d). Ekspresija GFAP u svim ispitivanim uzorcima mozga kokošaka je označena kao izrazita.



**Slika 55.** Ekspresija glijalnog kiselog proteina u mozgu kokošaka: a) IHC pozitivni astroцити na GFAP x 100 b) IHC pozitivni astroцити na GFAP x 200 c) uvećani IHC pozitivni astroцити na GFAP x400 d) uvećani IHC pozitivni astroцити na GFAP x400.

## 5.7. Razlike u zastupljenosti makroskopskih promena u odabranim organima labudova i kokoški

Statističkom analizom učestalosti makroskopskih promena u odabranim organima labudova i kokoški, utvrđene su statistički značajne razlike u učestalosti pojava promena na pankreasu i bubrežima.

Primenom Fisher exact testa ustanovljena je statistički vrlo značajna razlika ( $p < 0,001$ ) u učestalosti pojave nekroza i petehija u pankreasu labudova (tabela 16).

**Tabela 16.** Razlike u učestalosti makroskopskih promena u pankreasu kod labudova i kokošaka

		Pankreas nekroze	
		Sa promenama	Bez promena
Vrsta životinje	Labudovi	93.3%	6.6%
	Kokoške	0	100%

		Pankreas petehije	
		Sa promenama	Bez promena
Vrsta životinje	Labudovi	46.6%	53.3%
	Kokoške	0	100%

Primenom Fisher exact testa ustanovljena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u učestalosti pojave krvavljenja u bubrežima (Tabela 17).

**Tabela 17.** Razlike u učestalosti makroskopskih promena u bubrezima kod labudova i kokošaka

		Bubreg krvavljenje	
		Sa promenama	Bez promena
Vrsta životinje	Labudovi	0	100%
	Kokoške	40%	60%

### 5.8. Razlike u zastupljenosti patohistoloških promena u organima labudova i kokoški

Statističkom analizom učestalosti patohistoloških promena na mozgu, slezini, plućima, srcu, crevima i bubrezima nije utvrđena statistički značajna razlika. Primenom Fisher exact testa utvrđena je statistički vrlo značajna razlika ( $p < 0,001$ ) u učestalosti pojave krvavljenja na pankreasu (Tabela 18).

**Tabela 18.** Razlike u zastupljenosti patohistoloških promena u pankreasu labudova i kokošaka.

		Pankreas krvavljenje	
		Sa promenama	Bez promena
Vrsta životinje	Labudovi	66.6%	33.3%
	Kokoške	0	100%

## 5.9. Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije virusnog antigena u organima labudova i kokošaka

Statističkom analizom prisustva i intenziteta ekspresije virusnog antigena u odabranim organima utvrđeno je da se on značajno češće i u većoj količini pojavljuje kod kokošaka u odnosu na labudove i to u sledećim organima: srce (Tabela 19), creva (Tabela 20) i pluća (Tabela 21).

**Tabela 19.** Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije virusnog antigena u srcu labudova i kokošaka.

		Srce			
		Negativno	Slabo_pozitivno	Umereno_pozitivno	Jako_pozitivno
Vrsta životinje	Labudovi	60%	33.3%	6.6%	0
	Kokoške	26.6%	6.6%	20%	46.6%

Primenom  $\chi^2$ -testa ustanovljena je statistički vrlo značajna razlika ( $\chi^2 = 13,318$ ,  $df=3$ ;  $p<0,001$ )

**Tabela 20.** Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije virusnog antigena u crevima labudova i kokošaka.

		Creva		
		Negativno	Umereno_pozitivno	Jako_pozitivno
Vrsta životinje	Labudovi	100%	0	0
	Kokoške	53.3%	13.3%	33.3%

Primenom  $\chi^2$ -testa ustanovljena je statistički značajna razlika ( $\chi^2 = 9,130$ ,  $df=2$ ;  $p<0,05$ )

**Tabela 21.** Razlike u zastupljenosti i intenzitetu ekspresije virusnog antigena u plućima labudova i kokošaka.

		Pluća			
		Negativno	Slabo_pozitivno	Umereno pozitivno	Jako_pozitivno
Vrsta životinje	Labudovi	26.6%	60%	13.3%	0
	Kokoške	20%	0	13.3%	66.6%

Primenom  $\chi^2$ -test testa ustanovljena je statistički vrlo značajna razlika ( $\chi^2 = 19143$ ,  $df=3$ ;  $p<0,001$ ).

## 6. DISKUSIJA

Infekcije izazvane visoko patogenim sojevima avijarne influence nanele su značajne gubitke živinarskoj proizvodnji širom sveta u poslednjih 20. godina. Procenjeno je da je tokom ovih epizootija uništeno nekoliko stotina miliona kokošaka i druge živine. Zbog svog potencijalnog zoonotskog karaktera i mogućnosti nastanka pandemija, virusi avijarne influence predstavljaju veliku opasnost i po zdravlje ljudi. Izrazita genetička varijabilnost i nestabilnost genoma virusa influence doprinose brzom evoluciji ovog patogena i nastanku novih podtipova sa izmenjenim osobinama u pogledu patogenosti i specifičnosti prema domaćinu. Globalno širenje visoko patogenog virusa AI H5N8 značajno je uvećalo fokus naučne zajednice o ulozi pojedinih vrsta divljih ptica u očuvanju i prenošenju virusa. Od prve detekcije ovog podtipa virusa AI na evropskom kontinentu (2014. godine) i tokom pisanja ove doktorske disertacije dosta se saznalo o patogenezu, osetljivosti pojedinih vrsta ptica i njihovoj ulozi u širenju virusa.

Visoko patogena avijarna influenza podtipa H5N8 prvi put je dijagnostikovana u našoj zemlji krajem 2016. godine kod labudova grpca (*Cygnus olor*) na lokalitetu specijalnog rezervata prirode “Koviljko-petrovaradinski rit” u Južnobačkom okrugu. Pored labudova, virus je dijagnostikovao i kod kokošaka gajenih u manjim seoskim domaćinstvima u Južnobačkom i Banatskom okrugu. Labudovi grpci su tokom ove epizootije bila najosetljivija vrsta divljih ptica, i najveći procenat mortaliteta i morbiditeta je zabeležen kod ove vrste ptica. U ovom radu prvi put u našoj zemlji su opisane morfološke, patohistološke i imunofenotipske karakteristike prirodne infekcije sojem influence H5N8 kod labudova, kao predstavnika divljih ptica vodenih staništa (red Anseriformes) i kod domaćih kokošaka, kao predstavnika galiformnih vrsta ptica. Pored toga, izvršena je molekularna karakterizacija i utvrđivanje genotipa izolovanog virusa.

Metodom real-time RT-PCR prisustvo virusa AI H5N8 dokazano je u svim ispitanim uzorcima poreklom od labudova i kokošaka. Molekularne metode RT-PCR i real time RT-PCR predstavljaju preporučene metode za dijagnostiku virusa influence A prema OIE-u (OIE, 2015). Prednosti RT-PCR molekularne metode u poređenju sa klasičnim

dijagnostičkim metodama, kao što su izolacija virusa i serološke metode, jeste u njenoj velikoj osetljivosti i brzini, mogućnosti analize većeg broja uzoraka, uključujući i one koji nisu podesni za izolaciju virusa (Fereidouni i sar., 2009). Pored toga, ovim metodama je moguće tačno kvantifikovati količinu virusnih čestica. Takođe, velika prednost ove metode ogleda se i u mogućnost detekcije genoma virusa AI u slučaju prisustva vrlo malih količina virusnih čestica u ispitivanom materijalu (WHO, 2002). Primenom molekularnih metoda moguće je praćenje virusa u prirodi kao i utvrđivanje rezervoara infekcije. Sve nabrojane činjenice govore u prilog značaju i prednosti molekularnih metoda u dijagnostici virusa avijarne influence u odnosu na klasične metode dijagnostike (Petrović i sar., 2006.)

Filogenetska ispitivanja virusa AI vršena su primenom softvera MEGA (verzija 6.0) i primenom “Maximum Composite Likelihood” i “Neighbor-Joining” algoritma (Tamura et al., 2004, 2013). Analizom dobijenog filogenetskog stabla utvrđena je sličnost detektovanog virusa HPAI H5N8 iz Srbije sa detektovanim virusima istog podtipa iz Hrvatske, Mađarske i Makedonije. Takođe, analizom je utvrđeno da detektovani virus u Srbiji pripada genogrupi - kladi 2.3.4.4 b, kao i virusi koji su cirkulisali u ostalim evropskim zemljama tokom 2016-2017. godine, što je bio i očekivan rezultat.

U literaturi postoji mnogo podataka o makroskopskim i patohistološkim promenama izazvanim avijarnim influenza virusima, svih kategorija patogenosti. Većina istraživanja rađena je na prirodnim i eksperimentalnim infekcijama kod domaće živine, pre svega kod kokošaka i ćuraka (Beard i Helfer, 1972.; Capua i Marangon, 2000; Cooley i sar., 1989; Laudert i sar., 1993a; Perdue i sar., 2000; Swayne i sar., 1992; Swayne i Slemons, 1995.; Swayne i Suarez, 2000; Webster i sar., 1992). Međutim, literaturni podaci o patobiologiji avijarne influence u uslovima prirodne infekcije kod labudova su znatno oskudniji.

Kod galiformnih vrsta ptica, pre svega kod kokošaka, glavne makroskopske promene izazvane visoko patogenim sojevima avijarne influence karakterišu se pojavom edema glave, periorbitalne regije, nogu i vrata, cijanozom kreste i podbradnjaka (Pantin-Jackwood i Swayne, 2009). Nastanak ovih lezija objašnjava se endoteliotropizmom određenih sojeva virusa AI koji dovode do teških oštećenja endotela krvnih sudova. Posledično dolazi do pojave multifokalnih nekroza u epidermisu i dermisu, akantolize i fibrinoidne nekroze zidova krvnih sudova (Kobayashi i sar., 1996a). U našim ispitivanjima,



navedene lezije su ustanovljene kod dve kokoške i to u vidu blage cijanoze kreste i podbradnjaka. Spoljašnjim pregledom leševa labudova, nisu uočeni edem glave i periorbitalne regije kao ni promene na koži koje su tipične za HPAI infekcije kod galiformnih vrsta. Do danas, u literaturi nisu opisane lezije u integumentumu divljih ptica inficiranih virusom AI podtipa H5N8, što može da ukaže na to da se replikacija ovog virusa ne odvija u endotelu krvnih sudova pomenute regije.

Leševi svih ispitanih ptica bili su dobrog kondicionog stanja i uhranjenosti, što je jedan od indikatora akutnog toka infekcije. Karakterističan nalaz uočen kod svih labudova bilo je prisustvo tačkastih krvavljenja, difuzno rasutih na mezenterijalnom masnom tkivu. Isti nalaz opisan je kod labudova prirodno inficiranih virusom AI podtipa H5N1, ali u manjem procentu zastupljenosti (Teifke i sar., 2007). U poređenju sa labudovima, kod ispitanih kokošaka uočene su veoma diskretne petehije u masnom tkivu mezenterijuma kod malog broja jedinki. U istraživanjima Aclanda i saradnika, identičan nalaz dobijen je i kod kokošaka inficiranih H5N2 virusom AI (Acland i sar., 1984), kao i brojlera prirodno inficiranih virusom H5N8 (Bae i sar., 2015).

Većina HPAI virusa se replikuje u endotelnim ćelijama dovodeći do povećane vaskularne permeabilnosti što rezultira pojavom edema i hemoragija u većini organa (Pantin-Jackwood i Swayne, 2009). Kod ispitivanih labudova, makroskopskim pregledom su utvrđene hemoragije u pankreasu, srcu, plućima i mozgu, dok su kod kokošaka zapažene na bubrezima, srcu, plućima i crevima.

Lezije na pankreasu u vidu nekroza, zapaljenja i krvavljenja su gotovo stalni nalaz kod ptica prirodno i eksperimentalno inficiranih visoko patogenim virusima avijarne influence i smatraju se patognomoničnim nalazom (Kalthoff i sar., 2008; Kim i sar., 2015; Pálmai i sar., 2007; Pantin-Jackwood i Swayne, 2009; Teifke i sar., 2007). Pojava akutnog pankreatitisa opisana je i kod infekcija pilića i ćurki niski patogenim sojevima virusa AI (Condobery i Slemons, 1992; Morales i sar., 2009; Mutinelli i sar., 2003; Okamatsu i sar., 2007; Shinya i sar., 1995). S obzirom da je replikacija LPAI virusa lokalno ograničena na respiratorni i crevni sistem, postavlja se pitanje na koji način LPAI virusi kolonizuju pankreas kod ovih vrsta ptica (Capua i sar., 2013). Kod ispitivanih labudova, lezije na pankreasu u vidu nekroza bile su prisutne kod svih jedinki, u vidu okruglastih, beličasto-

rozih polja, dijametra 2-5 mm. Mrljasta i petehijalna krvavljenja su takođe bila čest nalaz. Patohistološkim pregledom utvrđena su područja multifokalne nekroze, sa infiltracijom tkiva mononuklearnim ćelijama, predominantno limfocita, kao i krvavljenja. Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su proučavali prirodnu infekciju labudova virusom AI podtipa H5N1 (Ogawa i sar., 2009; Pálmai i sar., 2007; Teifke i sar., 2007; Vasković i sar., 2011). U našim ispitivanjima pankreasa kokošaka, makroskopskim pregledom ustanovljen je netipičan nalaz u vidu odsustva promena na ovom organu. Međutim, patohistološkim pregledom pankreasa kokošaka utvrđene su multifokalne nekroze.

Prema literaturnim podacima, lezije na srcu u vidu petehijalnog krvarenja u subepikardijumu i masnom tkivu srca su čest nalaz kod živine i divljih ptica inficiranih HPAI virusima (Kwon i sar., 2010; Pálmai i sar., 2007). U našim ispitivanjima, subepikardijalna krvavljenja kod labudova zabeležena su kod svih ispitanih jedinki. Na endokardu su zapažena prugasta krvavljenja. Masno tkivo epikarda je bilo zahvaćeno petehijalnim krvarenjima kod većine ispitanih jedinki. Mikroskopski, ustanovljene promene u srcu labudova bile su u vidu tačkastih krvavljenja subepikardijalno, dok su u miokardu uočena masivna krvavljenja. U nekoliko slučajeva uočen je limfocitni infiltrat perimizijalno, a kod jedne jedinke utvrđena je degeneracija kardiomiocita. Isti makroskopski i mikroskopski nalaz na srcu je zabeležen kod labudova prirodno i eksperimentalno inficiranih virusom AI podtipa H5N1 (Kwon et al., 2010; Ogawa i sar., 2009; Vasković i sar., 2011). Slične makroskopske lezije su zapažene na srcu kokošaka. Patohistološkim pregledom srca kokošaka ustanovljene su promene u vidu subepikardijalnog krvavljenja i krvavljenja u miokardu, nalaz hemosideroze kao posledica obilnog krvavljenja, kao i distrofija kardiomiocita.

Bubrezi su kod svih ispitanih labudova bili bez makroskopski vidljivih promena. Isti nalaz utvrđen je i kod labudova prirodno inficiranih virusom podtipa H5N1 (Ogawa i sar., 2009; Pálmai i sar., 2007; Teifke i sar., 2007) i virusom podtipa AI H5N6 (Tsunekuni i sar., 2018). Iako u ispitivanjima labudova inficiranih virusima AI H5N1 i H5N6 nisu ustanovljene makroskopske i patohistološke lezije, našim ispitivanjem ustanovljene su promene u vidu nekroze tubulocita, kod polovine ispitanih jedinki. Renomegalija, bledilo

parenhima bubrega kao i izražena lobularna površina čest su nalaz kod domaće živine inficirane visoko patogenim sojevima AIV. Taloženje urata u ureterima je čest pratilac ovih promena (Bertran i sar., 2011; Perkins i Swayne, 2001). Kod ispitanih kokošaka, makroskopske promene na bubrezima uočene su kod skoro polovine ispitanih jedinki u to vidu kongestije i krvavljenja. Patohistološkim nalazom utvrđene su tubulonekroze kao i hiperemija i krvavljenja kod polovine ispitanih kokošaka. Isti nalaz navode autori koji su se bavili ispitivanjem prirodne infekcije brojlera virusom AI H5N8 (Bae i sar., 2015).

Lezije koje su tipične za infekcije izazvane nisko patogenim sojevima virusa influence u vidu fibrinopurulentne inflamacije gornjeg respiratornog trakta, sinusa i vazdušnih vreća (Mo i sar., 1997; Hooper i Selleck, 1998) nisu utvrđene kod ispitivanih kokošaka i labudova. Makroskopskim pregledom pluća labudova utvrđena su krvavljenja, edem i kongestija kod većine ispitanih jedinki. Isti makroskopski nalaz je zapažen i kod kokošaka, ali u manjem procentu zastupljenosti. Patohistološkim pregledom pluća labudova utvrđena je hiperemija krvnih sudova, obimna krvavljenja, kongestija, edem, dok je kod jednog labuda uočena intersticijalna pneumonija. Kod većine ispitanih kokošaka, dominantan patohistološki nalaz bile su hemoragije i hiperemija krvnih sudova u plućima. Pojava kongestije i krvavljenja na plućima su tipičan nalaz za HPAI infekcije i zapaženi su u prirodnim i eksperimentalnim uslovima infekcije, kako kod galiformnih vrsta tako i kod divljih ptica (Anis i sar., 2018; Bae i sar., 2015; Kim i sar., 2015; Perkins i Swayne, 2001; Perkins and Swayne, 2003).

Pored visoke stope mortaliteta, kod ispitanih labudova zabeležen je i veliki procenat jedinki sa nervnim simptomima bolesti. Ti simptomi su podrazumevali otežano kretanje, opistotonus, vrtenje i plivanje u krug i ataksiju. Sličan klinički nalaz opisan je kod farmskih i divljih pataka prirodno inficiranih virusom influence podtipa H5N8 (Bányai i sar., 2016; Kim i sar., 2015).

U istraživanjima prirodnih i eksperimentalnih infekcija ptica virusom AI podtipa H5N1 dokazano je da je neurotropizam glavno svojstvo ovog virusa (Breithaupt i sar., 2011; Brown i sar., 2006; Ellis i sar., 2004a; Klopfleisch i sar., 2006; Perkins i Swayne 2002; Szeredi i sar., 2010; Terregino i sar., 2006). Takođe, dokazano je da je virus neurotropan i u prirodnim i eksperimentalnim infekcijama različitih vrsta sisara, uključujući

domaće mačke, tigrove, leoparde, kune, feretke, crvene lisice i miševe. Kod ljudi je virus AI H5N1 dokazan u mozgu i cerebrospinalnoj tečnosti, ali o neuropatogenezi postoji veoma malo podataka u literaturi, s obzirom na to da je mali broj autopsija rađen na ljudima koji su umrli od ove virusne infekcije (Gao i sar., 2010; Gu i sar., 2007; De Jong i sar., 2005; Korteweg i Gu, 2008).

Klinički i patološki nalaz kod ptica inficiranih neurotrofnim sojevima virusa AI zavise od mnogih faktora, pre svega od uzrasta i zdravstvenog statusa jedinke, urođenog i stečenog imuniteta, gustine populacije ptica, načina ulaska virusa u organizam kao i količini unetog virusa. Time se objašnjavaju varijacije u pogledu osetljivosti na infekciju kod različitih vrsta ptica. Nisko patogeni sojevi virusa avijarne influence su široko zastupljeni u populaciji divljih vodenih ptica i smatraju se prirodnim domaćinom ovih virusa. Postavljena je hipoteza da pojedine vrste divljih ptica u toku života steknu otpornost i antitela na LPAI viruse što im delimično stvara zaštitu za HPAI virusne infekcije. Ova tvrdnja je potvrđena u eksperimentalnim uslovima, gde je kod divljih pataka, labudova i kanadskih gusaka dokazano da prethodno izlaganje LPAI virusima može da utiče na ishod infekcije sa visoko patogenim H5N1 virusom (Bröjer i sar., 2012).

Makroskopskim pregledom mozga labudova utvrđene su promene u vidu hiperemije, jake iniciranosti krvnih sudova, hiperemije moždanica kao i pojavom edema kod jedne jedinke. Patohistološkim pregledom mozgova labudova uočena je neuronalna satelioza, neuronofagija i nakupljanje limfocitnog infiltrata u velikom mozgu. Kod dva labuda uočena je encefalomalacija. U malom mozgu uočena su masivna krvavljenja, fokalne nekroze i perivaskularno nakupljanje limfocita. U većini slučajeva uočen je limfocitni infiltrat u meningama. Ovi nalazi su u skladu sa ispitivanjima prirodne infekcije neurotrofnim virusom H5N1 kod labudova (Bröjer i sar., 2012). Kod kokošaka, makroskopskim pregledom mozga ustanovljene su promene u vidu hiperemije i iniciranosti krvnih sudova kod većine jedinki kao i edem mozga kod jedne jedinke. Histopatološkim pregledom moždanog tkiva uočene su promene u vidu glioze, hiperemije krvnih sudova, encefalomalacije i satelitoze sa neuronofagijom. U prirodnim i eksperimentalnim infekcijama visoko patogenim sojevima AI najčešće zabeležene mikroskopske promene su u vidu edema neuropila, nekroze neurona, glioze, nakupljanja mononuklearnog ćelijskog

infiltrata perivaskularno kao i meningoencefalitisa (Acland i sar., 1984; Kobayashi i sar., 1996b; Mo i sar., 1997), što je u skladu sa našim nalazima kod obe vrste ptica.

U obe ispitivane grupe ptica, makroskopski nalaz na slezini bio je u vidu uvećanja (splenomegalije), kongestije i pojave belih nekrotičnih polja na površini. Opisane promene na slezini mogu da izostanu kod ptica inficiranih visoko patogenim sojevima virusa AI. Patohistološkim pregledom slezine utvrđene su promene u vidu multifokalnih nekroza, hiperemije krvnih sudova, masivnog krvavljenja i pojave hemosideroze kod većine ispitanih uzoraka. Splenomegalija je opisana kod više različitih galiformnih vrsta inficiranih virusom AI H5N1 (Perkins i Swayne, 2001).

Makroskopske lezije na crevima obe vrste ptica manifestovale su u vidu tačkastih krvavljenja ne serozi, pojavom hemoragija u mukozni creva kao i nalazom sluzavo-hemoragičnog sadržaja u lumenu tankih creva. Opisane lezije su retko bile zastupljene u obe ispitane grupe i sličan nalaz dobijen je u ispitivanjima prirodne infekcije labudova virusom H5N1 (Pálmai i sar., 2007). Autori koji su se bavili ispitivanjima HPAI infekcije kod različitih vrsta ptica od lezija na gastrointestinalnom sistemu najčešće navode pojavu krvavljenja u mukozni ventrikulusa i proventrikulusa, kao i u cecalnim tonzilama (Perkins i Swayne, 2001; Pantin-Jackwood i Swayne, 2009). Navedene makroskopske promene nisu utvrđene u našem ispitivanju. Histopatološke promene na crevima kod obe vrste ptica manifestovale su se u vidu blagog kataralnog enteritisa, sa infiltracijom limfocita u submukozni. Različiti autori navode da su najučestalije mikroskopske promene na crevima kod ptica inficiranih HPAI virusima u vidu deplecije limfocita, nekroze epitelni ćelija i enteritisa (Pantin-Jackwood i Swayne, 2009).

Za detekciju virusnog antigena u tkivima inficiranih ptica, u našem istraživanju primenjena je imunohistohemijska metoda. Imunohistohemijska metoda je široko zastupljena u dijagnostičkim laboratorijama, još od pedesetih godina prošlog veka, kada je prvi put opisana od strane Coons i Kaplan (Coons i Kaplan, 1950). Ovom metodom se dokazuje bliska povezanost između morfološke lokalizacije virusnog antigena sa histološkim lezijama kao i kliničkim manifestacijama bolesti (Vascellari i sar., 2006). Primenom imunohistohemijske metode može se detektovati virusni antigen čak i u organima i tkivima u kojima nisu evidentne patološke promene, čime se dokazuje i virusni

tropizam prema određenom tkivu (Nicholls i sar., 2012). U našim ispitivanjima to je i potvrđeno u slučaju pankreasa kokošaka gde je makroskopskim pregledom konstatovano odustvo patoloških promena, ali je metodom imunohistohemije detektovana velika količina ćelija pozitivnih na nukleoprotein virusa AI. Takođe, makroskopskim pregledom bubrega svih labudova nisu uočene patološke promene ali je prisustvo virusnog antigena imunohistohemijski dokazano kod određenog broja jedinki.

Metoda imunohistohemije se primenjuje u dijagnostici virusa avijarne influence korišćenjem specifičnih antitela na nukleoprotein ili hemaglutinin virusa (Gao i sar., 1999; Gu i sar., 2007; Guarner i sar., 2006). U toku procesa fiksacije tkiva u formalinu dolazi do otklanjanja lipidnog omotača virusa i narušavanja konformacije hemaglutinina usled čega dolazi do inaktivacije virusa (King, 1991; Okamoto i sar., 2004). Inaktiviranjem virusa influence redukovana je mogućnost izlaganja živom virusu, što predstavlja veliku prednost ove dijagnostičke metode (He i sar., 2009). Nukleoprotein influenza virusa je najviše konzerviran i obilno eksprimiran u odnosu na ostale virusne antigene i iz tog razloga je najprikladniji dijagnostički target za antigensku detekciju (Nicholls i sar., 2012).

Za detekciju virusnog antigena u tkivima inficiranih ptica, u našem istraživanju korišćena su poliklonska antitela na nukleoprotein virusa avijarne influence. Virusni antigen je imunohistohemijski dokazan kod obe vrste ptica u sledećim ispitanim organima: mozgu, pankreasu, bubrezima, slezini, plućima i srcu. Izuzetak predstavljaju creva labudova, jer virusni antigen nije detektovan u crevnom epitelu kod ove vrste. Imunohistohemijskom metodom je dokazano da virus avijarne influence pokazuje lokalizaciju prvenstveno u ćelijama monocitno-makrofagnog sistema, ali je dokazano njegovo prisustvo i u epitelnim ćelijama, uključujući epitelne ćelije bubrežnih tubula, bronhoalveolarnog epitela, crevnog epitela kod kokošaka kao i u ćelijama endotela. Imunopozitivne ćelije na virusni antigen pokazuju izraženu citoplazmatsku lokalizaciju koja se ogleda u nalazu obilnih precipitata braon boje u citoplazmi. Najintenzivniji imunohistohemijski signal kod labudova je zapažen u mozgu, pankreasu i slezini, dok je kod kokošaka najveća ekspresija virusnog antigena zabeležena u mozgu, pankreasu i plućima. Imunohistohemijskom metodom detekcije virusnog antigena u nekoliko organa inficiranih labudova i kokošaka ustanovljene su razlike u distribuciji i ekspresiji virusa.

Naime, razlika se pre svega odnosi na ekspresiju i distribuciju virusa u plućima, srcu i crevima. Kod ispitivanih labudova utvrđen je veoma mali broj pozitivnih makrofaga u alveolama pluća. U ispitivanjima prirodne infekcije labudova sa virusom podtipa H5N1 dokazano je prisustvo svega nekoliko pozitivnih ćelija u endotelu kapilara i arterija pluća (Teifke i sar., 2007; Vasković i sar., 2011), što je u skladu sa našim nalazom. Sa druge strane, kod kokošaka je ustanovljena jaka ekspresija virusnog antigena u plućima, virus je detektovan u makrofagama alveola, a takođe i u endotelu krvnih sudova. Isti nalaz je dobijen u eksperimentalnoj infekciji kokošaka virusom podtipa H5N1 (Perkins i Swayne, 2001). U srcu ispitivanih labudova, imunohistohemijskom metodom je utvrđeno nekoliko pozitivnih kardiomiocita i slaba ekspresija virusnog antigena u ovom organu, što je u skladu sa nalazima prirodne i eksperimentalne infekcije labudova virusom podtipa H5N1 (Kalthoff i sar., 2008; Ogawa i sar., 2009; Teifke i sar., 2007). U istraživanjima Kim i saradnika, kod labudova prirodno inficiranih virusom AI podtipa H5N8 nije utvrđeno prisustvo virusnog antigena u srcu (Kim i sar., 2015). Naši rezultati i rezultati drugih autora pokazuju da ne postoji zavisnost između intenziteta patomorfoloških lezija i distribucije virusnog antigena u srcu labudova. Za razliku od labudova, kod kokošaka je utvrđena jaka ekspresija virusnog antigena u srcu. Prisustvo velikog broja imunopozitivnih kardiomiocita zabeležen je u uslovima eksperimentalne infekcije kokošaka inficiranih virusom AI H5N8 (Usui i sar., 2017).

U crevima labudova imunohistohemijskom metodom nije utvrđeno prisustvo virusnog antigena. U istraživanjima H5N1 infekcije kod labudova, dokazano je odsustvo ili blaga ekspresija virusnog antigena u crevima, što može da ukazuje na to da se kod ove vrste ptica primarno širenje HPAI virusa odvija orofaringealnim putem (Szeredi i sar., 2010; Vasković i sar., 2011). Takođe, kod divljih ptica inficiranih virusom AI H5N8 nije utvrđena imunopozitivnost u crevima (Kim i sar., 2015). Sa druge strane, kod kokošaka je utvrđena jaka ekspresija virusnog antigena u crevima što je u skladu sa nalazima drugih autora (Grund i sar., 2018; Pohlmann i sar., 2017b).

U pankreasu obe vrste ptica je uočena jaka ekspresija virusnog antigena i to prvenstveno u nekrotičnim ćelijama i makrofagima. Dokazana je jaka veza između intenziteta imunohistohemijske reakcije i zastupljenosti patohistoloških promena u ovom

organu. Lokalizacija virusnog antigena u pankreasu je dokazana u više studija o prirodnim i veštačkim infekcijama HPAI virusima kod različitih vrsta ptica (Bae i sar., 2015; Bertran, i sar., 2011; Kim i sar., 2015; Perkins i Swayne, 2001). U slezini većine inficiranih labudova i kokošaka lokalizovana je velika količina nukleoproteina virusa AI. Virusni antigen je eksprimiran u makrofagima i endotelu krvnih sudova. Kod labudova je virusni antigen u slezini dokazan kod 80% ispitanih jedinki dok je kod kokošaka dokazan kod 66.6% ispitanih jedinki. Iako je nalaz virusnog antigena u slezini različitih vrsta ptica često dokumentovan (Bae i sar., 2015; Perkins i Swayne, 2001; Teifke i sar., 2007; Vasković i sar., 2011), pojedini autori navode odsustvo imunopozitivnosti u ovom organu (Kim i sar., 2015; Ogawa i sar., 2009; Perkins i Swayne, 2003; Vascellari i sar., 2007). Iako kod labudova inficiranih HPAI virusima mogu da izostanu makroskopske promene na bubrezima (Tsunekuni i sar., 2018), što je potvrđeno i u našim ispitivanjima, u ovom organu je uočena umereno pozitivna reakcija vezana za prisustvo nukleoproteina virusa AI H5N8. Pojedini autori takođe navode različite patološke nalaze i distribuciju virusnog antigena u bubrezima kod različitih vrsta domaće živine inficiranih H5N8 i H5N2 virusima AI (Bertran i sar., 2017). U našim ispitivanjima, virusni antigen je detektovan u malom broju ispitanih uzoraka bubrega i to u epitelu tubula kao i u endotelu kapilara glomerula, kod obe vrste ispitivanih ptica. Sličan nalaz podudara se sa podacima drugih autora koji su proučavali HPAI infekcije kod živine i različitih vrsta divljih ptica, uključujući i labudove grpce (Bertran i sar. 2011; Kim i sar., 2015; Perkins i Swayne, 2001; Szeredi i sar., 2010; Teifke i sar., 2007; Vasković i sar., 2011).

Virusni antigen je kod svih ispitivanih labudova detektovan u citoplazmi i nukleusu neurona i glija ćelija u malom i velikom mozgu. Multifokalna distribucija virusnog antigena ukazuje na hematogeno širenje virusa. Međutim, kod ispitivanih labudova virusni antigen nije uočen u endotelu krvnih sudova mozga ukazujući na to da virus u mozgu nije diseminiran putem endotelnih ćelija. Isti nalaz dobijen je i kod labudova prirodno inficiranih virusom AI H5N1 (Teifke i sar., 2007). Kod ispitivanih kokošaka virusni antigen je takođe obilno eksprimiran u svim delovima mozga, sa tom razlikom što je kod ove vrste ptica antigen virusa utvrđen u endotelu krvnih sudova mozga. Ovaj nalaz je i očekivan obzirom da je endoteliotropizam virusa influence česta pojava kod galiformnih



vrsta ptica (Swayne, 2007). Uzimajući u obzir činjenicu da su patohistološke lezije i distribucija virusnog antigena uočene u svim delovima mozga kod obe vrste ptica, može se zaključiti da ovaj podtip virusa influence ima visok afinitet ka nervnom tkivu ovih ptica. Patohistološkim pregledom mozgova ispitivanih labudova i kokošaka, promene u vidu negnojnog encefalitisa utvrđene su kod većine ptica. Imuhohistohemijskom metodom dokazana je velika ekspresija virusnog nukleoproteina u različitim delovima mozga, što ukazuje na jak neurotropizam virusa AI podtipa H5N8 kod ovih vrsta ptica. Kako bi se utvrdila distribucija reaktivnih astrocita u mozgu inficiranih ptica korišćena su monoklonska antitela na glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP).

Astroцити су зvezdolike ćelije distribuirane unutar mozga i kičmene moždine. Dele se na protoplazmatske i fibrozne, na osnovu morfologije i distribucije u CNS-u. Protoplazmatski astroцити су dominantno zastupljeni u sivoj masi dok se fibrozni pretežno nalaze u beloj masi. Kada se koriste klasične metode bojenja kao što je hematoksilin-eozin, astroцити imaju svetlo ovalno jedro sa veoma slabo uočljivom citoplazmom. Nekada je teško uočiti razliku između astroцита i malih neurona, ali za razliku od astroцита kod kojih je jedarce neuočljivo, kod malih neurona ono je jasno izraženo. Primenom specifičnih metoda bojenja kao što je impregnacija metalima ili imunohistohemijom moguće je u potpunosti uočiti strukturu astroцита (Montgomery, 1994). Glijalni fibrilarni kiseli protein (*eng.* Glial Fibrillary Acidic Protein - GFAP) je glavni intermedijarni filament u zreлим astroцитима u CNS-u. Kao član familije proteina citoskeleta, ima bitnu ulogu u održavanju stabilnosti i oblika astocitnih nastavaka kao i u moduliranju motiliteta astroцита. U CNS-u viših kičmenjaka, reakcija astroцита na oštećenje, povredu, bolest ili na dejstvo hemijskog agensa jeste hipertrofija astroцита ili astroglioza i hiperplazija astroцита ili astrocitoza. Astroglioza se karakteriše brзом sintezom GFAP, što se može dokazati iminohistohemijskim bojenjem sa monoklonskim antitelom na GFAP (Eng i sar., 2000). U toku astroglioze dolazi do povećanja tela i nastavaka ćelija, astroцити postaju izrazito eozinofilni i mogu biti uočljivi u HE preparatima (Montgomery, 1994). Proliferacija astroцита – astrocitoza i hipertrofija - astroglioza opisane su kod virusnih encefalitisa različitih vrsta ptica (Kommers i sar., 2002; Zaid i sar., 2016). U istraživanjima Bröjer i saradnika, ova reakcija astroцита nije detektovana kod prirodne infekcije virusom H5N1 kod različitih vrsta divljih ptica (Bröjer

i sar., 2012). U mnogim istraživanjima dokazano je da je za proliferaciju astrocita potrebno od jednog do nekoliko dana, a na brzinu proliferacije utiču mnogi različiti faktori kao što su vrsta oštećenja CNS-a, starost jedinke, trajanje bolesti (Montgomery, 1994). U našim ispitivanjima, GFAP pozitivni astrociti su bili otečeni i uvećani i mogli su se uočiti u malom i velikom mozgu kod obe vrste ptica, ukazujući na astrocitozu.

U cilju determinacije fenotipskog profila ćelija zapaljenskog infiltrata u organima inficiranih ptica primenjen je metod imunohistohemije. O determinisanju fenotipa ćelija inflamacije kod ptica inficiranih virusom AI primenom imunohistohemije u literaturi postoji veoma malo podataka. Većina istraživanja o identifikaciji populacije limfocita u infekciji virusom AI kod ptica vršena su primenom protočne citometrije (Fair i sar., 2008; Kwon i sar., 2008; Singh i sar., 2010). Histološkim pregledom utvrđeno je da su dominantne ćelije u zapaljenskom infiltratu svih ispitanih organa obe vrste ptica bili limfociti i makrofagi. Mononuklearne ćelije su bile organizovane u vidu difuznih infiltrata u većini organa. Rezultati imunohistohemijske analize su pokazali da CD3<sup>+</sup> ćelije (T limfociti) činile dominantnu ćelijsku populaciju u zapaljenskom infiltratu kod obe vrste ptica. Kod labudova, najveća ekspresija CD3<sup>+</sup> limfocita uočena je u crevima, slezini, mozgu i bubrezima. Analizom preparata ustanovljeno je da su u crevima, slezini i bubrezima CD3<sup>+</sup> limfociti u najvećem broju uzoraka bili difuzno raspoređeni po čitavom preseku tkiva, dok su se u uzorcima mozga mogle uočiti i fokalne distribucije u obliku limfnih agregata. Rezultati Brojer i saradnika dokazuju da su u mozgu labudova prirodno inficiranih virusom AI H5N1 najdominantnija ćelijska populacija bili CD3<sup>+</sup> limfociti kao i makrofagi (aktivirane mikroglia ćelije). Ovi autori naglašavaju veoma bitnu ulogu T limfocita u toku inflamatornog procesa u CNS-u izazvanog virusima AI H5N1 kod različitih vrsta divljih ptica (Bröjer i sar., 2012). Analizom preparata kod kokošaka utvrđeno je da je populacija CD3<sup>+</sup> ćelija najviše eksprimirana u crevima i slezini.

Za identifikaciju B ćelija u našem istraživanju korišćeno je monoklonsko antitelo CD21. Analizom tkivnih isečaka ustanovljeno je da na CD21 antitelo pozitivno reaguju pojedinačni limfociti u mozgu, plućima, bubrezima i pankreasu labudova, dok su kod kokošaka ustanovljeni u crevima, plućima, slezini i srcu. U svim ispitanim uzrocima tkiva obe vrste ptica, B limfociti bili su organizovani u obliku pojedinačnih, difuzno rasutih

ćelija, u veoma malom broju. Takođe, metodom imunohistohemije detektovan je mali broj B pozitivnih ćelija u mozgu divljih ptica prirodno inficiranih virusom H5N1, obeleženih monoklonskim antitelom CD79a (Bröjer i sar., 2012). Moench i Griffin su u svojoj studiji o virusnom encefalitisu miševa ukazali na potencijalne razloge zbog kojih se pojedine ćelije inflamacije ne mogu detektovati imunohistohemijski. Naime, pojedine ćelije se nalaze u različitim stadijumima aktivacije i proliferacije i iz tog razloga mogu biti prisutne u količinama koje su ispod praga detekcije za primenjeni marker. Drugo, primenjena antitela ponekad nemaju u potpunosti pristup ćelijskim receptorima, i vezivanje antitela za ćelijske receptore može biti ometeno pre svega zbog guste apozicije ćelija u tkivnim preparatima u odnosu na ćelije u živom tkivu. Kao treću mogućnost navode da ćelije inflamacije koje nisu detektovane imunohistohemijskom metodom predstavljaju dodatnu klasu imunih ćelija koje učestvuju u imunom odgovoru (Moench i Griffin, 1984). Uzimajući u obzir činjenicu da do danas u literaturi ne postoje podaci o fenotipizaciji ćelija inflamacije u toku H5N8 infekcija primenom imunohistohemijske metode, dalja istraživanja bi trebala da se fokusiraju na primenu različitih B-ćelijskih markera kao i CD4 i CD8 antitela u cilju diferencijacije T ćelija. S obzirom da se mnogi parametri ne mogu kontrolisati u uslovima prirodne infekcije, prednost eksperimentalnih istraživanja se ogleda i u mogućnosti praćenja nastanka inflamatorne reakcije i uloge pojedinih ćelija u inflamaciji.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih ispitivanja i dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Virus avijarne influence podtipa H5N8 dokazan je u svim ispitivanim uzorcima poreklom od kokošaka i labudova metodama real-time RT-PCR i imunohistohemijski.
2. Filogenetskim analizama dokazano je da izolovani virus pripada kladi 2.3.4.4 i grupi b, kao i srodnost virusa sa izolatima iz Mađarske, Hrvatske i Makedonije.
3. Dominantne makroskopske promene uočene na tkivima obe vrste ptica su: nekroze i krvavljenja u većini organa. Statistički značajna razlika u makroskopskim promenama kod labudova i kokošaka utvrđena je u pankreasu, u vidu krvavljenja i nekroza ( $p < 0,001$ ), dok je u bubrezima utvrđena razlika u pojavi krvavljenja ( $p < 0,05$ ). U ostalim organima obe vrste ptica nisu utvrđene značajne razlike u ispoljavanju makroskopskih promena.
4. Patohistološke promene kod obe vrste ptica najčešće su bile zastupljene u mozgu, pankreasu, slezini, srcu i plućima, u vidu hiperemije, nekroze i krvavljenja. Mikroskopskim pregledom je potvrđeno da se krvavljenja u pankreasu nalaze samo kod labudova, a izostaju kod kokošaka. Statističkom analizom patohistoloških promena u pankreasu labudova i kokošaka utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ).
5. Imunohistohemijskom metodom virusni antigen je dokazan u organima u kojima nisu utvrđene makroskopski vidljive promene – u bubrezima labudova, i pankreasu kokošaka.

6. Kod obe vrste ptica, intenzivna ekspresija virusnog antigena dokazana je u mozgu i pankreasu. Utvrđeno je da virus AI podtipa H5N8 pokazuje tropizam prema makrofagima, epitelnim ćelijama, endotelnim ćelijama i nervnom tkivu.
7. Razlike u zastupljenosti i ekspresiji virusnog antigena utvrđene su u srcu ( $p < 0,001$ ), plućima ( $p < 0,001$ ), i crevima ( $p < 0,05$ ), sa intenzivnijom ekspresijom virusnog antigena kod kokošaka u odnosu na labudove.
8. Kod labudova nije uočeno prisustvo virusnog antigena u crevnom epitelu, što bi moglo da ukaže na primarnu ekskreciju virusa kod ove vrste ptica orofaringealnim putem.
9. Pojava nervnih simptoma bolesti, negnojnog encefalitisa, ekspresije virusnog antigena u neuronima i brojnih GFAP+ astrocita kod obe vrste ptica, ukazuje na neurotropno svojstvo virusa.
10. Imunohistohemijskom analizom utvrđeno je da dominantnu ćelijsku populaciju u mononuklearnom inflamatornom infiltratu čine CD3+ T limfociti.
11. Veliki procenat mortaliteta i morbiditeta prirodno inficiranih labudova ukazuje na visoku osetljivost ove vrste na HPAI H5N8 infekciju. Hipotezu da ova vrsta ptica nema status dugoročnog nosioca virusa AI podtipa H5N8, treba potvrditi daljim istraživanjima.

## 8. SPISAK LITERATURE

1. Abdelwhab, E.-S.M., Veits, J. and Mettenleiter, T.C. (2013), “Genetic changes that accompanied shifts of low pathogenic avian influenza viruses toward higher pathogenicity in poultry”, *Virulence*, Vol. 4 No. 6, pp. 441–452.
2. Abramson, J.S., Lyles, D.S., Heller, K.A. and Bass, D.A. (1982), “Influenza A Virus-Induced Polymorphonuclear Leukocyte Dysfunction”, *Infection and Immunity*, Vol. 37 No. 2, pp. 794–799.
3. Acland, H.M., Bachin, L.A.S. and Eckroade, R.J. (1984), “Lesions in Broiler and Layer Chickens in an Outbreak of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection”, *Veterinary Pathology*, Vol. 21 No. 6, pp. 564–569.
4. Adlhoch, C., Brouwer, A., Kuiken, T., Mulatti, P., Smietanka, K., Staubach, C., Willeberg, P., et al. (2018), “Avian influenza overview November 2017 - February 2018”, *EFSA Journal*, Vol. 16 No. doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5240.
5. Adlhoch, C., Brown, I.H., Angelova, S.G., Bálint, Bouwstra, R., Buda, S., Castrucci, M.R., et al. (2016), “Highly pathogenic avian influenza a(H5N8) outbreaks: Protection and management of exposed people in Europe, 2014/15 and 2016”, *Eurosurveillance*, Vol. 21 No. 49, 30419.
6. Alexander, D.J. (2000), “A review of avian influenza in different bird species”, *Veterinary Microbiology*, Vol. 74 No. 1–2, pp. 3–13.
7. Alexander, D.J. (2003), “Avian Influenza: Historical Aspects”, *Avian Diseases*, American Association of Avian Pathologists, Special Issue. Second International Symposium on Avian Influenza. 1986 Proceedings, Vol. 47, pp 4-13.
8. Alexander, D.J. (2007), “An overview of the epidemiology of avian influenza”, *Vaccine*, Vol. 25 No. 30 SPEC. ISS., pp. 5637–5644.
9. Alexander, D.J., Allan, W.H., Parsons, D.G. and Parsons, G. (1978), “The pathogenicity of four avian influenza viruses for fowls, turkeys and ducks.”, *Research in Veterinary Science*, Vol. 24 No. 2, pp. 242–7.
10. Anis, A., AboElkhair, M. and Ibrahim, M. (2018), “Characterization of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus from Egyptian domestic waterfowl in 2017”, *Avian Pathology*, Vol. 47 No. 4, pp. 400–409.

11. Austin, F.J. and Webster, R.G. (1993), “Evidence of ortho- and paramyxoviruses in fauna from Antarctica”, *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 29 No. 4, pp. 568–571.
12. Bae, Y.J., Lee, S.B., Min, K.C., Mo, J.S., Jeon, E.O., Koo, B.S., Kwon, H.I., et al. (2015), “Pathological Evaluation of Natural Cases of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, Subtype H5N8, in Broiler Breeders and Commercial Layers in South Korea.”, *Avian Diseases*, Vol. 59 No. 1, pp. 175–82.
13. Bano, S., Naeem, K. and Malik, S.A. (2003), “Evaluation of Pathogenic Potential of Avian Influenza Virus Serotype H9N2 in Chickens”, *Avian Diseases*, Vol. 47 No. s3, pp. 817–822.
14. Bányai, K., Bistyák, A.T., Thuma, Á., Gyuris, É., Ursu, K., Marton, S., Farkas, S.L., et al. (2016), “Neuroinvasive influenza virus A(H5N8) in fattening ducks, Hungary, 2015”, *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 43, pp. 418–423.
15. Beard, C.W. and Helfer, D.H. (1972). “Isolation of two turkey influenza viruses in Oregon.”, *Avian Diseases*, Vol. 16 No. 5, pp. 1133–6.
16. Becker, W.B. (1966), “The isolation and classification of Tern virus: Influenza Virus A/Tern/South Africa/1961”, *Journal of Hygiene*, Vol. 64, No.3, 309-20.
17. Beerens, N., Heutink, R., Bergervoet, S.A., Harders, F., Bossers, A. and Koch, G. (2017), “Multiple Reassorted Viruses as Cause of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Epidemic, the Netherlands, 2016”, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 23 No. 12, pp. 1974–1981.
18. Benedictis, P. De, Beato, M.S. and Capua, I. (2007), “Inactivation of Avian Influenza Viruses by Chemical Agents and Physical Conditions: A Review”, *Zoonoses and public health*, Vol. 54, No.2, pp. 51–68.
19. Bertran, K., Dolz, R., Busquets, N., Gamino, V., Vergara-Alert, J., Chaves, A.J., Ramis, A., et al. (2013), “Pathobiology and transmission of highly and low pathogenic avian influenza viruses in European quail (*Coturnix c. coturnix*).”, *Veterinary Research*, BioMed Central, Vol. 44 No. 1, p. 23.
20. Bertran, K., Dolz, R., Majó, N., Bertran, K., Dolz, R. and Majó, N. (2014), “Pathobiology of avian influenza virus infection in minor gallinaceous species: a review, *Avian Pathology*, Vol. 9457 No. March, pp. 9–25.
21. Bertran, K., Lee, D.H., Pantin-Jackwood, M.J., Spackman, E., Balzli, C., Suarez, D.L. and Swayne, D.E. (2017), “Pathobiology of Clade 2.3.4.4 H5Nx High-Pathogenicity Avian Influenza Virus Infections in Minor Gallinaceous Poultry Supports Early Backyard Flock Introductions in the Western United States in 2014-



2015”, *Journal of Virology*, Vol. 91 No. 21, e00960-17.

22. Bertran, K., Pérez-Ramírez, E., Busquets, N., Dolz, R., Ramis, A., Darji, A., Abad, F., et al. (2011), “Pathogenesis and transmissibility of highly (H7N1) and low (H7N9) pathogenic avian influenza virus infection in red-legged partridge (*Alectoris rufa*)”, *Veterinary Research*, Vol. 42 No. 1, p. 24.
23. Bonfante, F., Patrono, L.V., Aiello, R., Beato, M.S., Terregino, C. and Capua, I. (2013), “Susceptibility and intra-species transmission of the H9N2 G1 prototype lineage virus in Japanese quail and turkeys.”, *Veterinary Microbiology*, Vol. 165 No. 1–2, pp. 177–83.
24. Boyce, W.M., Sandrock, C., Kreuder-Johnson, C., Kelly, T. and Cardona, C. (2009), “Avian influenza viruses in wild birds: A moving target”, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 32 No. 4, pp. 275–286.
25. Božić, B., Pajić, M., Petrović, T., Pelić, M., Samojlović, M. and Polaček, V. (2016), “Pathologic Changes in Swans Infected With Highly Pathogenic Avian Influenza ( H5N8 ) Virus”, *Archives of Veterinary Medicine*, Vol. 9 No. 2, pp. 77–86.
26. Breithaupt, A., Kalthoff, D., Dale, J., Bairlein, F., Beer, M. and Teifke, J.P. (2011), “Neurotropism in Blackcaps ( *Sylvia atricapilla* ) and Red-Billed Queleas ( *Quelea quelea* ) After Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 Infection”, *Veterinary Pathology*, Vol. 48 No. 5, pp. 924–932.
27. Bröjer, C., Ågren, E.O., Uhlhorn, H., Bernodt, K., Jansson, D.S. and Gavier-Widén, D. (2012), “Characterization of Encephalitis in Wild Birds Naturally Infected by Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1”, *Avian Diseases*, Vol. 56 No. 1, pp. 144–152.
28. Brown, I., Kuiken, T., Mulatti, P., Smietanka, K., Staubach, C., Stroud, D., Therkildsen, O.R., et al. (2017), “Avian influenza overview September – November 2017”, *EFSA Journal*, Vol. 15 No. 12, doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5141.
29. Brown, J.D., Stallknecht, D.E., Beck, J.R., Suarez, D.L. and Swayne, D.E. (2006), “Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses.”, *Emerging Infectious Diseases*, Centers for Disease Control and Prevention, Vol. 12 No. 11, pp. 1663–70.
30. Brown, J.D., Stallknecht, D.E. and Swayne, D.E. (2008), “Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage”, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 14 No. 1, pp. 136–142.

31. Brown, J.D., Swayne, D.E., Cooper, R.J., Burns, R.E. and Stallknecht, D.E. (2007). Persistence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses in Water, *Avian Diseases*, Vol. 51, 285–289.
32. Calder, L.J., Wasilewski, S., Berriman, J.A. and Rosenthal, P.B. (2010), “Structural organization of a filamentous influenza A virus”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 107 No. 23, pp. 10685–10690.
33. Capua, I. and Alexander, D.J. (2002), “Avian influenza and human health.”, *Acta Tropica*, Vol. 83 No. 1, pp. 1–6.
34. Capua, I. and Alexander, D.J. (2004), “Avian influenza: recent developments”, *Avian Pathology*, Vol. 33 No. 4, pp. 393–404.
35. Capua, I. and Alexander, D.J. (2009), “Avian influenza infection in birds: A challenge and opportunity for the poultry veterinarian”, *Poultry Science*, Vol. 88 No. 4, pp. 842–846.
36. Capua, I. and Cattoli, G. (2013), “Prevention and control of highly pathogenic avian influenza with particular reference to H5N1”, *Virus Research*, Vol. 178 No. 1, pp. 114–120.
37. Capua, I. and Marangon, S. (2000), “The avian influenza epidemic in Italy, 1999—2000: A review”, *Avian Pathology*, Vol. 29 No. 4, pp. 289–294.
38. Capua, I., Mercalli, A., Pizzuto, M.S., Romero-Tejeda, A., Kasloff, S., De Battisti, C., Bonfante, F., et al. (2013), “Influenza A Viruses Grow in Human Pancreatic Cells and Cause Pancreatitis and Diabetes in an Animal Model”, *Journal of Virology*, Vol. 87 No. 1, pp. 597–610.
39. Capua, I., Mutinelli, F., Terregino, C., Cattoli, G., Manvell, R.J. and Burlini, F. (2000), “Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches farmed in Italy.”, *The Veterinary Record*, Vol. 146 No. 12, p. 356.
40. Cardona, C.J., Xing, Z., Sandrock, C.E. and Davis, C.E. (2009), “Avian influenza in birds and mammals”, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 32 No. 4, pp. 255–273.
41. Cauten, A.N., Swayne, D.E., Schultz-Cherry, S., Perdue, M.L. and Suarez, D.L. (2000), “Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans.”, *Journal of Virology*, American Society for Microbiology (ASM), Vol. 74 No. 14, pp. 6592–9.

42. CEC. Council Directive 2005, 94, EC of 20, on December 2005 Community measures for the control of avian influenza and repealing Directive 92/40/EEC. *Off J Eur Comm.* 2006;L10:16–65.
43. Chen, H., Smith, G.J.D., Li, K.S., Wang, J., Fan, X.H., Rayner, J.M., Vijaykrishna, D., et al. (2006), “Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences, Vol. 103 No. 8, pp. 2845–50.
44. Cheng, V.C.C., To, K.K.W., Tse, H., Hung, I.F.N. and Yuen, K.-Y. (2012), “Two Years after Pandemic Influenza A/2009/H1N1: What Have We Learned?”, *Clinical microbiology reviews*, Vol. 25, No. 2, pp. 223-263.
45. Condobery, P.K. and Slemons, R.D. (1992), “Biological Properties of Waterfowl-Origin Type A Influenza Viruses in Chickens”, *Avian Diseases*, American Association of Avian Pathologists, Vol. 36 No. 1, p. 17.
46. Cooley, A.J., Van Campen, H., Philpott, M.S., Easterday, B.C. and Hinshaw, V.S. (1989), “Pathological Lesions in the Lungs of Ducks Infected with Influenza A Viruses”, *Veterinary Pathology*, Vol. 26 No. 1, pp. 1–5.
47. Coons, A.H. and Kaplan, M.H. (1950), “Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.”, *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 91 No. 1, pp. 1–13.
48. Dalby, A.R. and Iqbal, M. (2015), “The European and Japanese outbreaks of H5N8 derive from a single source population providing evidence for the dispersal along the long distance bird migratory flyways.”, *PeerJ*, Vol. 3, p. e934.
49. Das, K., Aramini, J.M., Ma, L.-C., Krug, R.M. and Arnold, E. (2010), “Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets”, *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 17 No. 5, pp. 530–538.
50. Davidson, W.R., Yoder, H.W., Brugh, M. and Nettles, V.F. (1988), “Serological Monitoring of Eastern Wild Turkeys for Antibodies to *Mycoplasma* spp. and Avian Influenza Viruses”, *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 24 No. 2, pp. 348–351.
51. De Jong, M.D., Cam, B. Van, Qui, P.T., Hien, V.M., Thanh, T.T., Hue, N.B., Beld, M., et al. (2005), “Fatal Avian Influenza A (H5N1) in a Child Presenting with Diarrhea Followed by Coma”, *New England Journal of Medicine*, Vol. 352 No. 7, pp. 686–691.
52. Dolka, B., Żbikowski, A., Dolka, I. and Szeleszczuk, P. (2016), “The response of mute swans (*Cygnus olor*, Gm. 1789) to vaccination against avian influenza with an

- inactivated H5N2 vaccine.”, *Acta Veterinaria Scandinavica*, BioMed Central, Vol. 58 No. 1, p. 74.
53. Ebrahimi, S.M., Ziapour, S., Tebianian, M., Dabaghian, M. and Mohammadi, M. (2011), “Study of Infection with an Iranian Field-Isolated H9N2 Avian Influenza Virus in Vaccinated and Unvaccinated Japanese Quail”, *Avian Diseases*, American Association of Avian Pathologists, Vol. 55 No. 2, pp. 195–200.
  54. EFSA. (2007), “Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission related with the vaccination against avian influenza of H5 and H7 subtypes as a preventive measure carried out in Member States in birds kept in zoos unde”, *EFSA Journal*, Vol. 5 No. 2, p. 450.
  55. EFSA (2014), Highly pathogenic avian influenza A subtype H5N8, *EFSA Journal* Vol 12., No.12, 3941
  56. Ellis, T.M., Barry Bousfield, R., Bissett, L.A., Dyrting, K.C., Luk, G.S.M., Tsim, S.T., Sturm-ramirez, K., et al. (2004a), “Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002”, *Avian Pathology*, Vol. 33 No. 5, pp. 492–505.
  57. Ellis, T.M., Leung, C.Y.H.C., Chow, M.K.W., Bissett, L.A., Wong, W., Guan, Y. and Malik Peiris, J.S. (2004b), “Vaccination of chickens against H5N1 avian influenza in the face of an outbreak interrupts virus transmission”, *Avian Pathology*, Vol. 33 No. 4, pp. 405–412.
  58. Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. and Lee, Y.L. (2000), “Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000)”, *Neurochemical Research*, Vol. 25 No. 9/10, pp. 1439–1451.
  59. Fair, J.M., Taylor-McCabe, K.J., Shou, Y. and Marrone, B.L. (2008), “Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: Individual variability and repeatability”, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 125 No. 3–4, pp. 268–273.
  60. Feare, C.J. (2010), “Role of Wild Birds in the Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 and Implications for Global Surveillance”, *Avian Diseases*, Vol. 54 No. s1, pp. 201–212.
  61. Fereidouni, S.R., Starick, E., Grund, C., Globig, A., Mettenleiter, T.C., Beer, M. and Harder, T. (2009), “Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses”, *Veterinary Microbiology*, Vol. 135 No. 3–4, pp. 253–260.

62. Fouchier, R.A.M., Munster, V.J., Keawcharoen, J., Osterhaus, A.D.M.E. and Kuiken, T. (2007), Virology of avian influenza in relation to wild birds, *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 43, No. 3, pp. 7-14.
63. Gao, P., Watanabe, S., Ito, T., Goto, H., Wells, K., McGregor, M., Cooley, A.J., et al. (1999), "Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong.", *Journal of Virology*, Vol. 73 No. 4, pp. 3184–9.
64. Gao, R., Dong, L., Dong, J., Wen, L., Zhang, Y., Yu, H., Feng, Z., et al. (2010), "A Systematic Molecular Pathology Study of a Laboratory Confirmed H5N1 Human Case", *P.PLoS One*, Vol. 5 No. 10, p. e13315.
65. Gilbert, M., Xiao, X., Domenech, J., Lubroth, J., Martin, V. and Slingenbergh, J. (2006), "Anatidae migration in the western Palearctic and spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus.", *Emerging Infectious Diseases*, Centers for Disease Control and Prevention, Vol. 12 No. 11, pp. 1650–6.
66. Grund, C., Hoffmann, D., Ulrich, R., Naguib, M., Schinköthe, J., Hoffmann, B., Harder, T., et al. (2018), "A novel European H5N8 influenza A virus has increased virulence in ducks but low zoonotic potential", *Emerging Microbes & Infections*, Vol. 7 No. 1, p. 132.
67. Gu, J., Xie, Z., Gao, Z., Liu, J., Korteweg, C., Ye, J., Lau, L.T., et al. (2007), "H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study", *The Lancet*, Vol. 370 No. 9593, pp. 1137–1145.
68. Guarner, J., Paddock, C.D., Shieh, W., Packard, M.M., Patel, M., Montague, J.L., Uyeki, T.M., et al. (2006), "Histopathologic and Immunohistochemical Features of Fatal Influenza Virus Infection in Children during the 2003–2004 Season", *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 43 No. 2, pp. 132–140.
69. He, F., Du, Q., Ho, Y. and Kwang, J. (2009), "Immunohistochemical detection of Influenza virus infection in formalin-fixed tissues with anti-H5 monoclonal antibody recognizing FFWTILKP", *Journal of Virological Methods*, Vol. 155 No. 1, pp. 25–33.
70. Hesterberg, U., Harris, K., Stroud, D., Guberti, V., Busani, L., Pittman, M., Piazza, V., et al. (2009), "Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006", *Influenza and Other Respiratory Viruses*, Vol. 3 No. 1, pp. 1–14.
71. Hinshaw, V.S., Olsen, C.W., Dybdahl-Sissoko, N. and Evans, D. (1994), "Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses.", *Journal of Virology*, Vol. 68 No. 6, pp. 3667–73.

72. Hinshaw, V.S., Webster, R.G. and Turner, B. (1979), "Water-bone transmission of influenza A viruses?", *Intervirology*, Vol. 11 No. 1, pp. 66–8.
73. Hooper and Selleck. (1998), "Pathology of Low and High Virulent Influenza Virus Infections, In Proc. Fourth International Symposium on Avian Influenza (D.E. Swayne & D.R. Slemons, eds). U.S. Animal Health Association, Richmond, VA, 134-141.
74. Hopkins, B.A., Skeeles, J.K., Houghten, G.E., Slagle, D. and Gardner, K. (1990), "A survey of infectious diseases in wild turkeys (*Meleagris Gallopavo Silvestris*) from Arkansas", *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 26 No. 4, pp. 468–472.
75. Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2005), "Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents", *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 3 No. 8, pp. 591–600.
76. Horimoto, T., Rivera, E., Pearson, J., Senne, D., Krauss, S., Kawaoka, Y. and Webster, R.G. (1995), "Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Mexico", *Virology*, Vol. 213 No. 1, pp. 223–230.
77. Humberd, J., Boyd, K. and Webster, R.G. (2007), "Emergence of influenza A virus variants after prolonged shedding from pheasants.", *Journal of Virology*, American Society for Microbiology, Vol. 81 No. 8, pp. 4044–51.
78. Humberd, J., Guan, Y. and Webster, R.G. (2006), "Comparison of the Replication of Influenza A Viruses in Chinese Ring-Necked Pheasants and Chukar Partridges", *Journal of Virology*, Vol. 80 No. 5, pp. 2151–2161.
79. Isoda, N., Sakoda, Y., Kishida, N., Bai, G.-R., Matsuda, K., Umemura, T. and Kida, H. (2006), "Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals", *Archives of Virology*, Vol. 151 No. 7, pp. 1267–1279.
80. Iwami, S., Suzuki, T. and Takeuchi, Y. (2009), "Paradox of Vaccination: Is Vaccination Really Effective against Avian Flu Epidemics?", *PLoS One*, Vol. 4 No. 3, p. e4915.
81. Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.-A., Wills, N.M., Xiao, Y.-L., Dunfee, R.L., et al. (2012), "An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response.", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 337 No. 6091, pp. 199–204.

82. Jeong, J., Kang, H.-M., Lee, E.-K., Song, B.-M., Kwon, Y.-K., Kim, H.-R., Choi, K.-S., et al. (2014), "Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014", *Veterinary Microbiology*, Elsevier, Vol. 173 No. 3–4, pp. 249–257.
83. Jeong, O.M., Kim, M.C., Kim, M.J., Kang, H.M., Kim, H.R., Kim, Y.J., Joh, S.J., et al. (2009), "Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus.", *Journal of Veterinary Science*, Vol. 10 No. 1, pp. 53–60.
84. Jones, Y.L. and Swayne, D.E. (2004), "Comparative Pathobiology of Low and High Pathogenicity H7N3 Chilean Avian Influenza Viruses in Chickens", *Avian Diseases*, Vol. 48 No. 1, pp. 119–128.
85. de Jong, M.D., Cam, B. Van, Qui, P.T., Hien, V.M., Thanh, T.T., Hue, N.B., Beld, M., et al. (2005), "Fatal Avian Influenza A (H5N1) in a Child Presenting with Diarrhea Followed by Coma", *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society, Vol. 352 No. 7, pp. 686–691.
86. Kalthoff, D., Breithaupt, A., Teifke, J.P., Globig, A., Harder, T., Mettenleiter, T.C. and Beer, M. (2008), "Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 14 No. 8, pp. 1267–1270.
87. Kawaoka, Y., Chambers, T.M., Sladen, W.L. and Webster, R.G. (1988), "Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks?", *Virology*, Vol. 163 No. 1, pp. 247–50.
88. Keawcharoen, J., van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W.E., van Lavieren, R., Osterhaus, A.D.M.E., et al. (2008), "Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1)", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 14 No. 4, pp. 600–607.
89. Kilpatrick, A.M., Chmura, A.A., Gibbons, D.W., Fleischer, R.C., Marra, P.P. and Daszak, P. (2006), "Predicting the global spread of H5N1 avian influenza", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 103 No. 51, pp. 19368–19373.
90. Kim, H.M., Kim, C.K., Lee, N.J., Chu, H., Kang, C., Kim, K. and Lee, J.Y. (2015), "Pathogenesis of novel reassortant avian influenza virus A (H5N8) Isolates in the ferret", *Virology*, Vol. 481, pp. 136–141.



91. Kim, H.R., Kwon, Y.K., Jang, I., Lee, Y.J., Kang, H.M., Lee, E.K., Song, B.M., et al. (2015), “Pathologic changes in wild birds infected with highly pathogenic avian influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014”, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 21 No. 5, pp. 775–780.
92. King, D.J. (1991). “Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum.”, *Avian Diseases*, Vol. 35 No. 3, pp. 505–14.
93. Klopfleisch, R., Werner, O., Mundt, E., Harder, T. and Teifke, J.P. (2006), “Neurotropism of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in Experimentally Infected Pigeons ( *Columbia livia* f. *domestica* )”, *Veterinary Pathology*, Vol. 43 No. 4, pp. 463–470.
94. Kobayashi, Y., Horimoto, T., Kawaoka, Y., Alexander, D.J. and Itakura, C. (1996a), “Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses”, *Avian Pathology*, Vol. 25 No. 2, pp. 285–304.
95. Kobayashi, Y., Horimoto, T., Kawaoka, Y., Alexander, D.J. and Itakura, C. (1996b), “Neuropathological studies of chickens infected with highly pathogenic avian influenza viruses”, *Journal of Comparative Pathology*, Vol. 114 No. 2, pp. 131–147.
96. Koch, G., Steensels, M. and van den Berg, T. (2009), “Vaccination of birds other than chickens and turkeys against avian influenza.”, *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, Vol. 28 No. 1, pp. 307–18.
97. Kodihalli, S., Sivanandan, V., Nagaraja, K. V., Shaw, D. and Halvorson, D.A. (1994), “Effect of Avian Influenza Virus Infection on the Phagocytic Function of Systemic Phagocytes and Pulmonary Macrophages of Turkeys”, *Avian Diseases, American Association of Avian Pathologists*, Vol. 38 No. 1, p. 93.
98. Kommers, G.D., King, D.J., Seal, B.S., Carmichael, K.P. and Brown, C.C. (2002), “Pathogenesis of six pigeon-origin isolates of Newcastle disease virus for domestic chickens”, *Veterinary Pathology*, Vol. 39 No. 3, pp. 353–362.
99. Korteweg, C. and Gu, J. (2008), “Pathology, Molecular Biology, and Pathogenesis of Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans”, *The American Journal of Pathology*, Vol. 172 No. 5, pp. 1155–1170.
100. Kou, Z., Lei, F.M., Yu, J., Fan, Z.J., Yin, Z.H., Jia, C.X., Xiong, K.J., et al. (2005), “New genotype of avian influenza H5N1 viruses isolated from tree sparrows in China.”, *Journal of Virology, American Society for Microbiology*, Vol. 79 No. 24, pp. 15460–6.

101. Kuribayashi, S., Sakoda, Y., Kawasaki, T., Tanaka, T., Yamamoto, N., Okamatsu, M., Isoda, N., et al. (2013), "Excessive Cytokine Response to Rapid Proliferation of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Leads to Fatal Systemic Capillary Leakage in Chickens", *PLoS ONE*, Vol. 8 No. 7, p. e68375.
102. Kwon, J.-S., Lee, H.J., Lee, D.H., Lee, Y.J., Mo, I.P., Nahm, S.S., Kim, M.J., et al. (2008), "Immune responses and pathogenesis in immunocompromised chickens in response to infection with the H9N2 low pathogenic avian influenza virus", *Virus Research*, Vol. 133 No. 2, pp. 187–194.
103. Kwon, Y.K., Joh, S.J., Kim, M.C., Lee, Y.J., Choi, J.G., Lee, E.K., Wee, S.H., et al. (2005), "Highly Pathogenic Avian Influenza in Magpies (*Pica pica sericea*) in South Korea", *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 41 No. 3, pp. 618–623.
104. Kwon, Y.K., Thomas, C. and Swayne, D.E. (2010), "Variability in Pathobiology of South Korean H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Virus Infection for 5 Species of Migratory Waterfowl", *Veterinary Pathology*, Vol. 47 No. 3, pp. 495–506.
105. Laudert, E., Halvorson, D., Sivanandan, V. and Shaw, D. (1993a), "Comparative evaluation of tissue tropism characteristics in turkeys and mallard ducks after intravenous inoculation of type A influenza viruses.", *Avian Diseases*, Vol. 37 No. 3, pp. 773–80.
106. Laudert, E., Sivanandan, V., Halvorson, D., Shaw, D. and Webster, R.G. (1993b). "Biological and molecular characterization of H13N2 influenza type A viruses isolated from turkeys and surface water.", *Avian Diseases*, Vol. 37 No. 3, pp. 793–9.
107. Laudert, E.A., Sivanandan, V. and Halvorson, D.A. (1993c), "Effect of intravenous inoculation of avian influenza virus on reproduction and growth in mallard ducks", *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 29 No. 4, pp. 523–526.
108. Lavoie, E.T., Sorrell, E.M., Perez, D.R. and Ottinger, M.A. (2007), "Immunosenescence and age-related susceptibility to influenza virus in Japanese quail.", *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 31 No. 4, pp. 407–14.
109. Lécuyer, A., De Langhe, C., Petit, T., Bernard, F. and Swam, H. (2009), "Serologic Response and Safety to Vaccination Against Avian Influenza Using Inactivated H5N2 Vaccine in Zoo Birds", *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Vol. 40 No. 4, pp. 731–743.

110. Lee, C.W. and Saif, Y.M. (2009), “Avian influenza virus”, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 32 No. 4, pp. 301–310.
111. Lee, D.H., Bertran, K., Kwon, J.H. and Swayne, D.E. (2017a), “Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4”, *Journal of Veterinary Science*, Vol. 18 No. S1, p. 269-280.
112. Lee, D.H., Sharshov, K., Swayne, D.E., Kurskaya, O., Sobolev, I., Kabilov, M., Alekseev, A., et al. (2017b), “Novel Reassortant Clade 2.3.4.4 Avian Influenza A(H5N8) Virus in Wild Aquatic Birds, Russia, 2016.”, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 23 No. 2, pp. 359–360.
113. Lee, D.H., Torchetti, M.K., Winker, K., Ip, H.S., Song, C.S. and Swayne, D.E. (2015), “Intercontinental Spread of Asian-Origin H5N8 to North America through Beringia by Migratory Birds”, *Journal of Virology*, Vol. 89 No. 12, pp. 6521–6524.
114. Lee, Y.J., Kang, H.M., Lee, E.K., Song, B.M., Jeong, J., Kwon, Y.K., Kim, H.R., et al. (2014), “Novel Reassortant Influenza A(H5N8) Viruses, South Korea, 2014”, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 20 No. 6, pp. 1086–1089.
115. Li, M., Liu, H., Bi, Y., Sun, J., Wong, G., Liu, D., Li, L., et al. (2017), “Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus in Wild Migratory Birds, Qinghai Lake, China”, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 23 No. 4, pp. 637–641.
116. Lupiani, B. and Reddy, S.M. (2009), “The history of avian influenza”, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Vol. 32 No. 4, pp. 311–323.
117. Lyon, J.A. and Hinshaw, V.S. (1991), “Replication of Influenza A Viruses in an Avian Macrophage Cell Line”, *Journal of General Virology*, Vol. 72 No. 8, pp. 2011–2013.
118. Lyon, J.A. and Hinshaw, V.S. (1993), “Inhibition of nitric oxide induction from avian macrophage cell lines by influenza virus.”, *Avian Diseases*, Vol. 37 No. 3, pp. 868–73.
119. Makarova, N. V, Ozaki, H., Kida, H., Webster, R.G. and Perez, D.R. (2003), “Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail.”, *Virology*, Vol. 310 No. 1, pp. 8–15.
120. Marchenko, V.Y., Susloparov, I.M., Kolosova, N.P., Goncharova, N.I., Shipovalov, A. V., Durymanov, A.G., Ilyicheva, T.N., et al. (2015), “Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014”, *Archives of Virology*, Vol. 160 No. 11, pp. 2857–2860.

121. Massagué, J., Cheifetz, S., Laiho, M., Ralph, D.A., Weis, F.M. and Zentella, A. (1992), "Transforming growth factor-beta.", *Cancer Surveys*, Vol. 12, pp. 81–103.
122. Mo, A.I.P., Brugh, M., Fletcher, O.J., Rowland, G.N., Swayne, D.E., Mo, I.P., Brugh, A.D.M., et al. (1997), "Comparative Pathology of Chickens Experimentally Inoculated with Avian Influenza Viruses of Low and High Pathogenicity, *Avian Diseases*, Vol. 41 No. 1, pp. 125–136.
123. Moench, T.R. and Griffin, D.E. (1984), "Immunocytochemical identification and quantitation of the mononuclear cells in the cerebrospinal fluid, meninges, and brain during acute viral meningoencephalitis.", *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 159 No. 1, pp. 77–88.
124. Montgomery, D.L. (1994), "Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease", *Veterinary Pathology*, Vol. 167, No.2, pp. 145–167.
125. Morales, A.C., Hilt, D.A., Williams, S.M., Pantin-Jackwood, M.J., Suarez, D.L., Spackman, E., Stallknecht, D.E., et al. (2009), "Biologic Characterization of H4, H6, and H9 Type Low Pathogenicity Avian Influenza Viruses from Wild Birds in Chickens and Turkeys", *Avian Diseases*, Vol. 53 No. 4, pp. 552–562.
126. Morens, D.M., Taubenberger, J.K. and Fauci, A.S. (2013), "H7N9 avian influenza A virus and the perpetual challenge of potential human pandemicity.", *MBio*, American Society for Microbiology, Vol. 4 No. 4, pp. e00445-13.
127. Morgan, I.R. and Westbury, H.A. (1981). "Virological studies of Adelie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica.", *Avian Diseases*, Vol. 25 No. 4, pp. 1019–26.
128. Munier, S., Larcher, T., Cormier-Aline, F., Soubieux, D., Su, B., Guigand, L., Labrosse, B., et al. (2010), "A Genetically Engineered Waterfowl Influenza Virus with a Deletion in the Stalk of the Neuraminidase Has Increased Virulence for Chickens", *Journal of Virology*, Vol. 84 No. 2, pp. 940–952.
129. Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., et al. (2007), "Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds", *PLoS Pathogens*, Vol. 3 No. 5, pp. 0630–0638.
130. Munster, V.J., Veen, J., Olsen, B., Vogel, R., Osterhaus, A.D.M.E. and Fouchier, R.A.M. (2006), "Towards improved influenza A virus surveillance in migrating birds", *Vaccine*, Elsevier, Vol. 24 No. 44–46, pp. 6729–6733.

131. Muramoto, Y., Ozaki, H., Takada, A., Park, C.-H., Sunden, Y., Umemura, T., Kawaoka, Y., et al. (2006), "Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens.", *Microbiology and Immunology*, Vol. 50 No. 1, pp. 73–81.
132. Mutinelli, F., Capua, I., Terregino, C. and Cattoli, G. (2003), "Clinical, Gross, and Microscopic Findings in Different Avian Species Naturally Infected During the H7N1 Low- and High-Pathogenicity Avian Influenza Epidemics in Italy During 1999 and 2000", *Avian Diseases*, Vol. 47 No. s3, pp. 844–848.
133. Nagy, A., Machova, J., Hornickova, J., Tomci, M., Nagl, I., Horyna, B. and Holko, I. (2007), "Highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in Mute swans in the Czech Republic.", *Veterinary Microbiology*, Vol. 120 No. 1–2, pp. 9–16.
134. Napp, S., Majó, N., Sánchez-González, R. and Vergara-Alert, J. (2018), "Emergence and spread of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) in Europe in 2016-2017", *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 65, No.5, pp. 1217-1226.
135. Narayan O. (1972), Pathogenesis of lethal influenza virus infection in turkeys. II. Central nervous system phase of infection, *Journal of Comparative Pathology*, Vol. 82, No.2, pp. 139-46.
136. Neufeld, J.L., Embury-Hyatt, C., Berhane, Y., Manning, L., Ganske, S. and Pasick, J. (2009), "Pathology of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Infection in Canada Geese (*Branta canadensis*); Preliminary Studies", *Veterinary Pathology*, Vol. 46 No. 5, pp. 966–970.
137. Nicholls, J.M., Wong, L.P.W., Chan, R.W.Y., Poon, L.L.M., So, L.K.Y., Yen, H.L., Fung, K., et al. (2012), "Detection of highly pathogenic influenza and pandemic influenza virus in formalin fixed tissues by immunohistochemical methods", *Journal of Virological Methods*, Vol. 179, No. 2, pp. 409–413.
138. Nili, H., Asasi, K., Dadras, H., Ebrahimi, M. and Ebrahimi, M. (2007), "Pathobiology of H9N2 Avian Influenza Virus in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*)", *Avian Diseases*, Vol. 51 No. s1, pp. 390–392.
139. Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H. and Kawaoka, Y. (2006), "Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles", *Nature*, Vol. 439 No. 7075, pp. 490–492.
140. Nuovo, G.J. (2006), "The surgical and cytopathology of viral infections: utility of immunohistochemistry, in situ hybridization, and in situ polymerase chain reaction amplification", *Annals of Diagnostic Pathology*, Vol. 10 No. 2, pp. 117–131.

141. Ogawa, S., Yamamoto, Y., Yamada, M., Mase, M. and Nakamura, K. (2009), "Pathology of Whooper Swans (*Cygnus cygnus*) Infected with H5N1 Avian Influenza Virus in Akita, Japan, in 2008", *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 71 No. 10, pp. 1377–1380.
142. OIE (2015). "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: OIE - World Organisation for Animal Health", Chapter 2.3.4, Avian Influenza - Infection with avian influenza viruses.
143. Okamatsu, M., Hiono, T., Kida, H. and Sakoda, Y. (2016), "Recent developments in the diagnosis of avian influenza", *Veterinary Journal*, Elsevier Ltd, Vol. 215, pp. 82–86.
144. Okamatsu, M., Saito, T., Yamamoto, Y., Mase, M., Tsuduku, S., Nakamura, K., Tsukamoto, K., et al. (2007), "Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005–2006", *Veterinary Microbiology*, Vol. 124 No. 1–2, pp. 35–46.
145. Okamoto, S., Kawabata, S., Fujitaka, H., Uehira, T., Okuno, Y. and Hamada, S. (2004), "Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection", *Vaccine*, Vol. 22 No. 21–22, pp. 2887–2893.
146. Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A.D.M.E. and Fouchier, R.A.M. (2006), "Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds", *Science*, Vol. 312 No. 5772, pp. 384–388.
147. Otsuki, K., Kawaoka, Y., Nakamura, T. and Tsubokura, M. (1982). "Pathogenicity for chickens of avian influenza viruses isolated from whistling swans and a black-tailed gull in Japan.", *Avian Diseases*, Vol. 26 No. 2, pp. 314–20.
148. Pálmai, N., Erdélyi, K., Bálint, Á., Márton, L., Dán, Á., Deim, Z., Ursu, K., et al. (2007), "Pathobiology of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in mute swans (*Cygnus olor*)", *Avian Pathology*, Vol. 36 No. 3, 245-9.
149. Pantin-Jackwood, M.J. and Swayne, D.E. (2009), "Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds.", *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, Vol. 28 No. 1, pp. 113–36.
150. Park, M.-S., Steel, J., Garcia-Sastre, A., Swayne, D. and Palese, P. (2006), "Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian influenza and Newcastle disease", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 103 No. 21, pp. 8203–8208.

151. Pasick, J., Berhane, Y., Embury-Hyatt, C., Copps, J., Kehler, H., Handel, K., Babiuk, S., et al. (2007), "Susceptibility of Canada Geese (*Branta canadensis*) to highly pathogenic avian influenza virus (H5N1).", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 13 No. 12, pp. 1821–7.
152. Perdue, M.L., Suarez, D.L. and Swayne, D.E. (2000), "Avian influenza in the 1990s.", *Poultry and Avian Biology Reviews*, Vol. 11 No. 1, pp. 1–20.
153. Perez, D.R., Lim, W., Seiler, J.P., Yi, G., Peiris, M., Shortridge, K.F. and Webster, R.G. (2003), "Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chickens.", *Journal of Virology*, Vol. 77 No. 5, pp. 3148–56.
154. Perkins L.E.L. and Swayne, D.E. (2001), "Pathobiology of A / Chicken / Hong Kong / 220 / 97 ( H5N1 ) Avian Influenza Virus in Seven Gallinaceous Species", *Veterinary Pathology*, Vol. 38 No. 2001, pp. 149–164.
155. Perkins, L.E.L. and Swayne, D.E. (2003), "Comparative Susceptibility of Selected Avian and Mammalian Species to a Hong Kong–Origin H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Virus", *Avian Diseases*, Vol. 47 No. s3, pp. 956–967.
156. Perkins, L.E.L. and Swayne, D.E. (2002). "Susceptibility of laughing gulls (*Larus atricilla*) to H5N1 and H5N3 highly pathogenic avian influenza viruses.", *Avian Diseases*, Vol. 46 No. 4, pp. 877–85.
157. Peschke, T., Bender, A., Nain, M. and Gemsa, D. (1993), "Role of macrophage cytokines in influenza A virus infections.", *Immunobiology*, Vol. 189 No. 3–4, pp. 340–55.
158. Petrović, T., Lazić, S., Kapetanov, M. and Velhner, M. (2006). Molekularna dijagnostika virusa avijarne influence - molecular diagnostics of avian influenza virus, *Veterinarski glasnik*, Vol.60, No 5-6, pp. 385 - 396.
159. Pillai, S.P.S., Pantin-Jackwood, M., Yassine, H.M., Saif, Y.M. and Lee, C.W. (2010), "The High Susceptibility of Turkeys to Influenza Viruses of Different Origins Implies Their Importance as Potential Intermediate Hosts", *Avian Diseases*, Vol. 54 No. s1, pp. 522–526.
160. Pohlmann, A., Starick, E., Harder, T., Grund, C., Höper, D., Globig, A., Staubach, C., et al. (2017a), "Outbreaks among Wild Birds and Domestic Poultry Caused by Reassorted Influenza A(H5N8) Clade 2.3.4.4 Viruses, Germany, 2016", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 23 No. 4, pp. 633–636.



161. Portela, A. and Digard, P. (2002), "The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication", *Journal of General Virology*, Vol. 83 No. 4, pp. 723–734.
162. Reperant, L.A., Kuiken, T. and Osterhaus, A.D.M.E. (2012), "Influenza viruses", *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, Taylor & Francis, Vol. 8 No. 1, pp. 7–16.
163. Rossman, J. and Lamb, R. (2011), "Influenza virus assembly and budding", *Virology*, Vol. 411 No. 2, pp. 229–236.
164. Rossman, J.S., Jing, X., Leser, G.P., Balannik, V., Pinto, L.H. and Lamb, R.A. (2010), "Influenza Virus M2 Ion Channel Protein Is Necessary for Filamentous Virion Formation", *Journal of Virology*, Vol. 84 No. 10, pp. 5078–5088.
165. Rott R. (1992), "The pathogenic determinant of influenza virus", *Veterinary Microbiology*, Vol. 33, No. 1-4, pp. 303-10.
166. Saito, T., Watanabe, C., Takemae, N., Chaisingh, A., Uchida, Y., Buranathai, C., Suzuki, H., et al. (2009), "Pathogenicity of highly pathogenic avian influenza viruses of H5N1 subtype isolated in Thailand for different poultry species", *Veterinary Microbiology*, Vol. 133 No. 1–2, pp. 65–74.
167. Schultz-Cherry, S. and Hinshaw, V.S. (1996), "Influenza Virus Neuraminidase Activates Latent Transforming Growth Factor", *Journal of Virology*, Vol. 70 No. 12, pp. 8624–8629.
168. Shalaby, A.A., Slemons, R.D. and Swayne, D.E. (1994), "Pathological Studies of A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8) Influenza Virus in Specific-Pathogen-Free Laying Hens", *Avian Diseases*, American Association of Avian Pathologists, Vol. 38 No. 1, p. 22.
169. Shinya, K., Awakura, T., Shimada, A., Silvano, F.D., Umemura, T. and Otsuki, K. (1995), "Pathogenesis of pancreatic atrophy by avian influenza a virus infection", *Avian Pathology*, Vol. 24 No. 4, pp. 623–632.
170. Short, K.R., Richard, M., Verhagen, J.H., van Riel, D., Schrauwen, E.J.A., van den Brand, J.M.A., Mänz, B., et al. (2015), "One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus", *One Health*, Vol. 1, pp. 1–13.
171. Singh, S., Briles, W.E., Lupiani, B. and Collisson, E.W. (2010), "Avian influenza viral nucleocapsid and hemagglutinin proteins induce chicken CD8+ memory T lymphocytes", *Virology*, Vol. 399 No. 2, pp. 231–238.

172. Spackman, E., Gelb, J., Preskenis, L.A., Ladman, B.S., Pope, C.R., Pantin-Jackwood, M.J., McKinley, E.T., et al. (2010), "The pathogenesis of low pathogenicity H7 avian influenza viruses in chickens, ducks and turkeys.", *Virology Journal*, BioMed Central, Vol. 7, p. 331.
173. Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., et al. (2002), "Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes.", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40 No. 9, pp. 3256–60.
174. Spackman, E. and Swayne, D.E. (2013), "Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: Current questions and new technology", *Virus Research*, Vol. 178 No. 1, pp. 121–132.
175. Stallknecht, D.E., Luttrell, M.P., Poulson, R., Goekjian, V., Niles, L., Dey, A., Krauss, S., et al. (2012), "Detection of avian influenza viruses from shorebirds: evaluation of surveillance and testing approaches.", *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 48 No. 2, pp. 382–93.
176. Suarez, D.L., Perdue, M.L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J. and Swayne, D.E. (1998), "Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong.", *Journal of Virology*, Vol. 72 No. 8, pp. 6678–88.
177. Suarez, D.L. and Schultz-Cherry, S. (2000), "Immunology of avian influenza virus: A review", *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 24 No. 2–3, pp. 269–283.
178. Swayne, D.E. (1997), "Pathobiology of H5N2 Mexican Avian Influenza Virus Infections of Chickens", *Veterinary Pathology*, Vol. 34 No. 6, pp. 557–567.
179. Swayne, D.E. (2007), "Understanding the Complex Pathobiology of High Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Birds", *Avian Diseases*, Vol. 51 No. s1, pp. 242–249.
180. Swayne, D.E. (2017), "Understanding the Complex Pathobiology of High Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Birds, *Avian Diseases* , Vol. 51 No. 1, 242-9.
181. Swayne, D.E. and Beck, J.R. (2005), "Experimental Study to Determine if Low-Pathogenicity and High-Pathogenicity Avian Influenza Viruses Can Be Present in Chicken Breast and Thigh Meat Following Intranasal Virus Inoculation", *Avian Diseases*, Vol. 49 No. 1, pp. 81–85.

182. Swayne, D.E., Ficken, M.D. and Guy, J.S. (1992), “Immunohistochemical demonstration of influenza A nucleoprotein in lungs of turkeys with natural and experimental influenza respiratory disease”, *Avian Pathology*, Vol. 21 No. 4, pp. 547–557.
183. Swayne D.E., Suarez D.L., Sims L.D. (2013). Influenza. In: *Diseases of Poultry*, Thirteenth Edition. Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nair, V., Nolan L.K. & Suarez D.L., eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 181–218.
184. Swayne, D.E. and Pantin-Jackwood, M. (2006), “Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry.”, *Developments in Biologicals*, Vol. 124, pp. 61–7.
185. Swayne, D.E. and Slemons, R.D. (1995). “Comparative pathology of intravenously inoculated wild duck- and turkey-origin type A influenza viruses in chickens.”, *Avian Diseases*, Vol. 39 No. 1, pp. 74–84.
186. Swayne, D.E. and Suarez, D.L. (2000), “Highly pathogenic avian influenza.”, *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, Vol. 19 No. 2, pp. 463–482.
187. Szeredi, L., Dán, Á., Pálmai, N., Ursu, K., Bálint, Á., Szeleczy, Z., Ivanics, É., et al. (2010), “Tissue tropism of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in naturally infected mute swans ( *Cygnus Olor* ), domestic geese ( *Anser Anser* var. *domestica* ), pekin ducks ( *Anas platyrhynchos* ) and mulard ducks ( *Cairina moschata* × *anas platyrhynchos* )”, *Acta Veterinaria Hungarica*, Vol. 58 No. 1, pp. 133–145.
188. Takizawa, T., Fukuda, R., Miyawaki, T., Ohashi, K. and Nakanishi, Y. (1995), “Activation of the Apoptotic Fas Antigen-Encoding Gene upon Influenza Virus Infection Involving Spontaneously Produced Beta-Interferon”, *Virology*, Vol. 209 No. 2, pp. 288–296.
189. Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. (2004), “Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 101 No. 30, pp. 11030–11035.
190. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013), “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.”, *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 30 No. 12, pp. 2725–9.
191. Tanimura, N., Tsukamoto, K., Okamatsu, M., Mase, M., Imada, T., Nakamura, K., Kubo, M., et al. (2006), “Pathology of Fatal Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus Infection in Large-billed Crows (*Corvus macrorhynchos* ) during the 2004 Outbreak in Japan”, *Veterinary Pathology*, Vol. 43 No. 4, pp. 500–509.

192. Taubenberger, J.K. and Kash, J.C. (2010), "Influenza Virus Evolution, Host Adaptation and Pandemic Formation", *Cell host & microbe*, Vol. 7 No. 6, pp. 440–451.
193. Teifke, J.P., Klopffleisch, R., Globig, a, Starick, E., Hoffmann, B., Wolf, P.U., Beer, M., et al. (2007), "Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in mute (Cygnus olor) and whooper (Cygnus cygnus) swans.", *Veterinary Pathology*, Vol. 44 No. 2, pp. 137–43.
194. Terregino, C., Milani, A., Capua, I., Marino, A.M.F. and Cavaliere, N. (2006), "Highly pathogenic avian influenza H5N1 subtype in mute swans in Italy.", *The Veterinary Record*, Vol. 158 No. 14, p. 491.
195. Thontiravong, A., Kitikoon, P., Wannaratana, S., Tantilertcharoen, R., Tuanudom, R., Pakpinyo, S., Sasipreeyajan, J., et al. (2012), "Quail as a potential mixing vessel for the generation of new reassortant influenza A viruses", *Veterinary Microbiology*, Vol. 160 No. 3–4, pp. 305–313.
196. To, K.F., Chan, P.K., Chan, K.F., Lee, W.K., Lam, W.Y., Wong, K.F., Tang, N.L., et al. (2001), "Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus.", *Journal of Medical Virology*, Vol. 63 No. 3, pp. 242–6.
197. Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M., Yang, H., et al. (2013), "New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses", *PLoS Pathogens*, Vol. 9 No. 10, e1003657.
198. Tsunekuni, R., Yaguchi, Y., Kashima, Y., Yamashita, K., Takemae, N., Mine, J., Tanikawa, T., et al. (2018), "Spatial transmission of H5N6 highly pathogenic avian influenza viruses among wild birds in Ibaraki Prefecture, Japan, 2016–2017", *Archives of Virology*, Vol. 163 No. 5, pp. 1195–1207.
199. Tumpey, T.M., Kapczynski, D.R. and Swayne, D.E. (2004), "Comparative Susceptibility of Chickens and Turkeys to Avian Influenza A H7N2 Virus Infection and Protective Efficacy of a Commercial Avian Influenza H7N2 Virus Vaccine", *Avian Diseases*, Vol. 48 No. 1, pp. 167–176.
200. USDA - United States Department of Agriculture (2015), "Reduction of Infectious Highly Pathogenic Avian Influenza Virus In Animal Agricultural Settings", pp. 1–8.
201. Usui, T., Soda, K., Tomioka, Y., Ito, H., Yabuta, T., Takakuwa, H., Otsuki, K., et al. (2017), "Characterization of clade 2.3.4.4 H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses from wild birds possessing atypical hemagglutinin polybasic cleavage sites", *Virus Genes*, Vol. 53 No. 1, pp. 44–51.

202. Vandegrift, K., Sokolow, S., Daszak, P. and Kilpatrick, A. (2010), "Ecology of avian influenza viruses in a changing world", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195, pp. 113–128.
203. Van den Brand, J.M., Krone, O., Wolf, P.U., van de Bildt, M.W.G., van Amerongen, G., Osterhaus, A.D.M.E. and Kuiken, T. (2015), "Host-specific exposure and fatal neurologic disease in wild raptors from highly pathogenic avian influenza virus H5N1 during the 2006 outbreak in Germany.", *Veterinary Research*, Vol. 46, p. 24.
204. Vascellari, M., Granato, A., Trevisan, L. and Basilicata. (2006), "Pathologic Finding of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Duck/Vietnam/12/05 (H5N1) in Experimentally Infected Pekin Ducks, Based on Immunohistochemistry and In Situ Hybridization", *Veterinary Pathology*, Vol. 44, No. 5, pp. 635–642.
205. Vascellari, M., Granato, A., Trevisan, L., Basilicata, L., Toffan, A., Milani, A. and Mutinelli, F. (2007), "Pathologic Findings of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A/Duck/Vietnam/12/05 (H5N1) in Experimentally Infected Pekin Ducks, Based on Immunohistochemistry and In Situ Hybridization", *Veterinary Pathology*, Vol. 44 No. 5, pp. 635–642.
206. Vasković, N., Šekler, M., Vidanović, D., Polaček, V., Kukolj, V., Matović, K. and Jovanović, M. (2011), "Pathomorphological lesions and distribution of viral antigen in birds infected with the pathogenic strain of H5N1 avian influenza virus", *Acta Veterinaria*, Vol. 61 No. 5–6, pp. 591–598.
207. Verhagen, J.H.J.H., Fouchier, R.A.M., Kuiken, T. and Ipskamp. (2016), *Influenza A Virus in Migratory Birds : Ecology, Evaluation and the Wild-Domestic Interface*, PhD thesis. Erasmus University Rotterdam, Rotterdam, the Netherlands, ISBN: 978-94-028-0294-8
208. Webby, R.J., Woolcock, P.R., Krauss, S.L. and Webster, R.G. (2002), "Reassortment and Interspecies Transmission of North American H6N2 Influenza Viruses", *Virology*, Academic Press, Vol. 295 No. 1, pp. 44–53.
209. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M. and Kawaoka, Y. (1992), "Evolution and ecology of influenza A viruses.", *Microbiological Reviews*, Vol. 56 No. 1, pp. 152–79.
210. Webster, R.G., Peiris, M., Chen, H. and Guan, Y. (2006), "H5N1 outbreaks and enzootic influenza.", *Emerging Infectious Diseases*, Centers for Disease Control and Prevention, Vol. 12 No. 1, pp. 3–8.

211. WHO (2002), World Health Organization, WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva : World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/68026>
212. WHO. (2014), “Human cases of influenza at the human–animal interface, 2013.”, *Wkly Epidemiol Rec*, Vol. 89 No. 28, pp. 309–20.
213. Wong, S.S.Y. and Yuen, K. (2006), “Avian Influenza Virus Infections in Humans”, *Chest*, The American College of Chest Physicians, Vol. 129 No. 1, pp. 156–168.
214. Wood, J.M., Webster, R.G. and Nettles, V.F. (1985). “Host range of A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus.”, *Avian Diseases*, Vol. 29 No. 1, pp. 198–207.
215. Woolcock, P.R. and Cardona, C.J. (2005), “Commercial Immunoassay Kits for the Detection of Influenza Virus Type A: Evaluation of Their Use with Poultry”, *Avian Diseases*, Vol. 49 No. 4, pp. 477–481.
216. Yoshida, H., Sakoda, Y., Endo, M., Motoshima, M., Yoshino, F., Yamamoto, N., Okamatsu, M., et al. (2011), “Evaluation of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a screening method for the detection of influenza viruses in the fecal materials of water birds.”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 73 No. 6, pp. 753–8.
217. Zaid, A., Ali, S.A.M., Morita, T. and Ballal, S. El. (2016), “Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in Brain Tissues after Experimental Infection with Newcastle Disease Virus: Comparative Study between Chicken and Duck”, *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 48 No. 2, pp. 40–45.
218. Zheng, W. and Tao, Y.J. (2013), “Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex”, *FEBS Letters*, Vol. 587 No. 8, pp. 1206–1214.